

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego



PRACA DOKTORSKA

**Analiza profili lipidowych wybranych układów biologicznych
metodą spektrometrii masowej TOF-SIMS**

Magdalena Marzec

Promotorzy:

Dr hab. Roman Pędrys

Dr hab. Dorota Wojtysiak

Kraków, luty 2018 r.

Oświadczenie

Ja niżej podpisana, *Magdalena Marzec* (nr indeksu: 1043426) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. *„Analiza profili lipidowych wybranych układów biologicznych metodą spektrometrii masowej TOF-SIMS”* jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem dr hab. Romana Pędrysa oraz dr hab. Doroty Wojtysiak. Pracę napisałam samodzielnie. Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami). Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

Kraków, dnia

.....
Podpis doktorantki

Podziękowania

*Dziękuję mojemu promotorowi **dr hab. Romanowi Pędrysowi** z Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego za zainteresowanie mnie tematyką spektrometrii masowej, umożliwienie wykonania eksperymentów oraz nieustającą opiekę.*

*Szczególne słowa podziękowań kieruję do mojej promotor **dr hab. Doroty Wojtysiak** z Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego za udostępnienie materiału badawczego, pomoc merytoryczną i cenne wskazówki.*

*Dziękuję wszystkim **pracownikom i doktorantom** Zakładu Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki UJ za przyjazną atmosferę pracy.*

*Wszystkim moim **Bliskim** dziękuję za pomoc i wsparcie, które mi okazali.*

Spis treści

STRESZCZENIE.....	6
ABSTRACT	8
MOTYWACJA I PLAN PRACY.....	10
CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	13
1. PODSTAWY BIOLOGICZNE.....	13
1.1. <i>Definicja i klasyfikacja lipidów.....</i>	<i>13</i>
1.2. <i>Podstawowe funkcje lipidów</i>	<i>16</i>
1.2.1. Kwasy tłuszczowe i ich pochodne	17
1.2.2. Glicerolipidy.....	21
1.2.3. Glicerofosfolipidy.....	21
1.2.4. Sfingolipidy.....	22
1.2.5. Steroidy	23
1.2.6. Prenole.....	24
1.2.7. Tkanka mięśniowa i tłuszczowa.....	25
1.2.8. Wpływ żywienia zwierząt na profile lipidowe.....	27
1.2.9. Procesy tenderyzacji i utleniania związków lipidowych.....	30
1.2.10. Metody badań profili lipidowych.....	31
2. FIZYCZNE PODSTAWY SPEKTROMETRII MAS WTÓRNYCH JONÓW	34
2.1. <i>Oddziaływanie energetycznych jonów z ciałem stałym.....</i>	<i>34</i>
2.2. <i>Procesy zderzeniowe w ciele stałym</i>	<i>36</i>
2.3. <i>Emisja powierzchniowych cząstek</i>	<i>37</i>
2.4. <i>Spektrometria masowa TOF-SIMS.....</i>	<i>39</i>
2.4.1. Działo jonowe.....	40
2.4.2. Analizator mas.....	41
2.4.3. Detekcja wtórnych jonów	44
2.5. <i>Mody pracy TOF-SIMS.....</i>	<i>45</i>
2.6. <i>Preparatyka próbek</i>	<i>46</i>
2.7. <i>Analiza danych eksperymentalnych</i>	<i>49</i>
2.8. <i>TOF-SIMS w badaniach profili lipidowych</i>	<i>51</i>
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	54
3. MATERIAŁY I METODY	56
3.1. <i>Hodowla i żywienie zwierząt.....</i>	<i>56</i>
3.2. <i>Przygotowanie próbek.....</i>	<i>57</i>
3.3. <i>Pomiary TOF-SIMS.....</i>	<i>58</i>
3.4. <i>Przygotowanie danych</i>	<i>60</i>
3.5. <i>Analiza statystyczna wyników.....</i>	<i>63</i>
4. WPŁYW ŻYWIENIA NA PROFILE LIPIDOWE.....	65
4.1. Kwasy tłuszczowe.....	68
4.2. Glicerolipidy.....	81
4.3. Glicerofosfolipidy	87
4.4. Sfingolipidy	97
4.5. Sterole.....	103
4.6. Prenole	108
5. WPŁYW PRZECHOWYWANIA CHŁODNICZEGO NA PROFILE LIPIDOWE.....	113
5.1. Kwasy tłuszczowe.....	113
5.2. Glicerolipidy.....	117
5.3. Glicerofosfolipidy	121
5.4. Sfingolipidy	125
5.5. Sterole.....	127
5.6. Prenole	130

PODSUMOWANIE.....	133
WNIOSKI.....	134
BIBLIOGRAFIA.....	135
ANEKS	152

Streszczenie

Niniejsza praca przedstawia wyniki badań wykorzystujących spektrometrię masową TOF-SIMS do analizy zmian profili lipidowych w tkankach mięśni piersiowych (*pectoralis superficialis*) kurcząt brojlerów Ross 308, zachodzących na skutek wpływu czynników środowiskowych. Zastosowana metoda fizyczna oparta jest na zjawiskach emisyjnych towarzyszących oddziaływaniu cząstek naładowanych z fazą skondensowaną. Dzięki technice TOF-SIMS możliwe jest zbadanie składu chemicznego powierzchni oraz przeprowadzenie, z wysoką czułością, analizy profilowej wewnętrznych warstw badanego materiału biologicznego, bez konieczności ekstrakcji badanych związków z układu biologicznego.

Zawartość poszczególnych lipidów w strukturach biologicznych, takich jak tkanki, jest regulowana wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. W pierwszym cyklu prac doświadczalnych, czynnikiem wywołującym zmiany poziomów lipidowych było zastosowanie różnych źródeł tłuszczu w diecie zwierząt hodowlanych. W drugim cyklu prac doświadczalnych, badano zmiany profili lipidowych, w próbkach tkanek mięśni piersiowych kurcząt broilerów, które są efektem różnego czasu przechowywania tkanki w warunkach chłodniczych.

Analiza zebranego materiału empirycznego wykazała, iż zastosowanie olejów roślinnych w diecie kurcząt broilerów istotnie wpływa na zmiany profilu lipidowego. W szczególności, suplementacja olejem lnianym zwiększyła udział wielonienasyconego kwasu tłuszczowego α -linolenowego (ω -3) we włóknach mięśniowych i w tłuszczu śródmięśniowym, w stosunku do grup niesuplementowanych tym źródłem tłuszczu. Analogiczny wynik uzyskano w przypadku suplementacji olejem sojowym będącym bogatym źródłem kwasu linolowego (ω -6). W obu badanych strukturach, najkorzystniejszy dla zdrowia stosunek kwasów tłuszczowych ω -6/ ω -3 otrzymano w grupie, w której zastosowano mieszaninę olejów roślinnych oraz w grupie suplementowanej olejem lnianym. Wzbogacanie paszy zwierząt jednym typem oleju roślinnego wywołuje istotny wzrost zawartości większości lipidów z grup glicerolipidów, głównie trójglicerydów, fosfatydylocholin, sfingolipidów oraz prenoli w obu badanych strukturach. Wykazano, iż rodzaj diety ma istotny wpływ na poziom cholesterolu w tkankach mięśni zwierząt hodowlanych. W grupach suplementowanych jednym typem oleju roślinnego wystąpiły znacząco mniejsze intensywności charakterystycznych jonów cholesterolu. Uzyskane wyniki przedyskutowano, dla każdej analizowanej grupy lipidowej, w aspekcie otrzymywania tzw. żywności funkcjonalnej, jak również efektów zdrowotnych mogących wystąpić w organizmie człowieka po spożywaniu mięsa zwierząt o zmodyfikowanej diecie.

W drugim cyklu prac doświadczalnych wykazano, iż długie przechowywanie tkanek mięśni w warunkach chłodniczych powoduje istotne

obniżenie zawartości większości lipidów. Jest to powodowane między innymi reakcjami utleniania związków lipidowych. Rezultaty wykonanych badań stanowią podstawę do rozważań nad czasem bezpiecznego przechowywania mięsa w warunkach chłodniczych.

Wyniki potwierdziły, iż technika TOF-SIMS jest skuteczną metodą do identyfikacji i analizy związków lipidowych w strukturze biologicznej. Technika ta, ma ogromny potencjał w odniesieniu do szerokiego spektrum zastosowań biofizycznych i medycznych.

Abstract

The main objective of this thesis was to analyze changes in lipid profiles in breast (*pectoralis superficialis*) muscle tissue of broiler chickens Ross 308, under different environmental factors, by using Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry method. This method is based on ion emission phenomena due to the interaction of charged particles with the condensed phase. Thanks to the TOF-SIMS technique, it is possible to examine the chemical composition of the surface and to perform, with high sensitivity, analysis of the profile of inner layers of the biological material without the need of extraction of examined compounds from the biological system.

The content of individual lipids in biological structures, such as tissues, is regulated by multiple genetic and environmental factors. In the first part of experimental work, changes in lipid levels were triggered with the use of various sources of fats in the diet of farm animals. In the second part of experimental work, the changes in fat levels in the samples of broiler chicken muscle tissues, which are the result of different time of tissue storage in refrigeration conditions, were investigated.

The analysis of the obtained results has shown that the use of vegetable oils in broiler chicken diets significantly influences changes in the lipid profile in the muscle tissue of broiler chickens. In particular, linseed oil supplementation increased the proportion of polyunsaturated fatty acid (α -linolenic acid, ω -3) in muscle fibres and intramuscular fat relative to groups non-supplemented with this oil source. Analogous results were obtained in the case of supplementation of soybean oil, being a rich source of linoleic acid (ω -6). Moreover, in both studied structures, the most favourable for health ω -6/ ω -3 fatty acid ratio were observed in the groups in which the mixture of vegetable oils and linseed oil was used. Animal feed enriched in one type of vegetable oil induces a significant increase in content of the majority of lipids from glycerolipids, especially triglycerides, phosphatidylcholine, sphingolipids and prenoli in both studied structures. It has been shown that the type of diet has a significant effect on cholesterol level in muscle tissues in farm animals. In groups supplemented with one type of vegetable oil, significantly lower amounts of cholesterol were present as evidenced by considerably lower intensities of detected characteristic cholesterol ions. The results obtained for each analyzed lipid group were discussed in the aspect of obtaining the functional foods and influence of meat consumption, obtained from animals with modified diets, on human's health.

In the second part of experimental work, it has been shown that the long storage of muscle tissues under refrigerated conditions determines a significant decrease of the majority of lipids. This is caused, inter alia, by the oxidation reactions of lipid compounds. The results of performed tests may provide information about the time in which certain lipids undergo oxidation reactions,

and could be the basis for considering the length of safe storage time of meat under refrigeration conditions.

The results of the comparative analysis confirmed that the TOF-SIMS technique is an effective method for comparing relative lipids levels and for determining the differences between the biological samples. This technique has enormous potential and opportunities in relation to a large number of possible biophysical and medical applications.

Motywacja i plan pracy

Prezentowana praca, pt. „*Analiza profili lipidowych wybranych układów biologicznych metodą spektrometrii masowej TOF-SIMS*” ma za zadanie przedstawić wyniki eksperymentalnych prac łączących określone zagadnienia biologiczne i nowatorską, fizyczną technikę badawczą, opartą o spektrometrię mas, tzw. wtórnych jonów. Głównym celem opisanych w rozprawie doktorskiej badań, było zastosowanie spektrometrii masowej do zbadania zmian profili lipidowych, powstałych na skutek czynników środowiskowych, w próbkach mięśni piersiowych kurcząt broilerów.

Uzyskiwanie nowych informacji na temat układów biologicznych, ich składników i zachodzących w tych układach procesach stwarza szanse na późniejsze zastosowanie zdobytych wiadomości w diagnostyce, leczeniu oraz na poprawę jakości i długości życia organizmów. Lipidy są niezbędnymi związkami do prawidłowego funkcjonowania organizmu, a utrzymywanie ich właściwych poziomów i proporcji minimalizuje zagrożenie wieloma chorobami, między innymi o podłożu metabolicznym, neurologicznym, czy też nowotworowym. Patologiczny, lipidowy skład błon biologicznych przyczynia się do inicjacji stanów zapalnych, powstawania nieprawidłowości w szlakach metabolicznych i braku równowagi w ustroju biologicznym. W konsekwencji, rozciągnięta w czasie zła gospodarka lipidowa doprowadza do przewlekłych chorób o tzw. podłożu cywilizacyjnym. Najprostszym i niezwykle skutecznym narzędziem przeciwdziałania takiemu scenariuszowi jest zbilansowana dieta, o odpowiedniej zawartości i proporcji tłuszczu. Jednym z najczęstszych produktów spożywanych w diecie człowieka, który dostarcza tłuszcz, jest mięso i produkty pochodzenia zwierzęcego. Fakt ten, stanowi dostateczną motywację do podjęcia badań nad składem mięsa, jak również badań nad zmianami składu mięsa na skutek czynników środowiskowych i genetycznych. Biorąc pod uwagę, iż mięso drobiowe jest jednym z najpopularniejszych mięs, a jego spożycie w krajach rozwiniętych cały czas rośnie, konieczna jest intensyfikacja działań udoskonalających proces hodowlany zwierząt, na przykład poprzez dobór właściwego żywienia. Znaczenia nabiera również sposób i czas przechowywania produktu mięsnego od chwili uboju zwierzęcia do momentu przetworzenia w celu konsumpcyjnym. Na przestrzeni ostatnich lat wykazano, iż spektrometria masowa TOF-SIMS jest wydajnym narzędziem do charakteryzowania poziomów lipidowych w układach biologicznych. Zastosowanie tego narzędzia badawczego do analizy zmian profili lipidowych w mięsie na skutek działania czynników środowiskowych może przyczynić się do uzyskania nowych, cennych informacji.

Pierwsza część pracy, obejmuje podstawy teoretyczne biologicznych i fizycznych zagadnień prezentowanej rozprawy. Zagadnienia z zakresu biologii omawiane są w rozdziale pierwszym, a drugi obejmuje opis fizycznych zjawisk leżących u podstaw użytej techniki badawczej wraz z charakterystyką

zastosowanej aparatury. Omawiając zagadnienia biologiczne, szczególną uwagę poświęcono związkom lipidowym, które stanowią jedno z najważniejszych składników biologicznych układów. Te wszechobecne, biologiczne cząsteczki, niegdyś uważane jedynie za magazyn energetyczny, we współczesnej biologii tworzą odrębną gałąź wiedzy, zwaną lipidomiką. Przedstawiono opis lipidów, ich definicję, klasyfikację oraz pełnione przez nie funkcje w układach biologicznych. Każda grupa lipidowa opisywana jest indywidualnie, z uwzględnieniem najważniejszych funkcji jakie pełnią i szlaków metabolicznych, w których uczestniczą.

Materiałem biologicznym objętym analizą są podstawowe struktury budulcowe - tkanki. Zwięzła charakterystyka tkanki mięśniowej i tłuszczowej jest treścią trzeciego podrozdziału w podstawach biologicznych. Zawarty w nim opis stanowi jedynie zarys charakterystyki tkanek, gdyż tkanki tworzące organizmy są niezwykle bogate w występujące w nich struktury, grupy składników i poszczególne elementy. Występowanie i ilościowa zawartość poszczególnych lipidów w tkankach jest wynikiem działania wielu czynników. Jednym z nich jest pożywienie dostarczane do organizmu. W kolejnym podrozdziale opisano wpływ wybranych składników paszy zwierząt na skład lipidowy mięśni. Opis ten oparty jest na dostępnych danych literaturowych. Innym, wpływającym na zawartość lipidową czynnikiem jest ekspozycja czasowa badanej tkanki w różnych warunkach przechowywania. Opis znaczenia wpływu czasu na zmianę zawartości poszczególnych lipidów obserwowaną w procesie przechowywania mięsa, w warunkach chłodniczych, znajduje się w kolejnym podrozdziale podstaw biologicznych. Zbadanie efektów działania wymienionych czynników na poziom określonych lipidów w tkankach, daje możliwość wykorzystania zdobytej wiedzy do intencjonalnej regulacji profilu lipidowych w strukturach biologicznych.

Dotychczas wykorzystano wiele metod badawczych do obserwacji występujących zmian na skutek wyżej wymienionych czynników. Opis niektórych z tych metod przedstawiono w ostatnim podrozdziale części biologicznej. Równocześnie warto zauważyć, że nieustannie są poszukiwane nowe techniki pomiarowe, które zaaplikowane do badań w dziedzinie biologii mogłyby odpowiedzieć na ciągle stawiane, nowe pytania. Jedną z tych metod jest spektrometria masowa wtórnych jonów emitowanych z badanych próbek pod wpływem bombardowania jonowego.

Technika TOF-SIMS (ang. *Time Of Flight - Secondary Ion Mass Spectrometry*) jest metodą fizyczną opartą na oddziaływaniu cząstek naładowanych z fazą skondensowaną. Charakterystyka tych oddziaływań oraz ich konsekwencje stanowią treść drugiego rozdziału części teoretycznej pracy. Szczegółowo scharakteryzowano aparaturę stosowaną w badaniach SIMS oraz konkretny spektrometr, dzięki któremu uzyskano wyniki umieszczone w pracy. Aplikacja określonej, fizycznej techniki badawczej, do zastosowań biologicznych, kreuje liczne problemy związane z preparatyką badanych materiałów. Problemy te i proponowane rozwiązania oraz sposoby analizy danych eksperymentalnych

przedstawiono w kolejnych dwóch podrozdziałach. Rozdział zamyka przegląd literatury poświęconej dotychczasowym badaniom lipidów w układach biologicznych za pomocą techniki SIMS.

W drugiej części pracy zamieszczono opis przeprowadzonych eksperymentów. Najpierw, opisano warunki hodowli zwierząt, preparatykę próbek, parametry przeprowadzonego eksperymentu oraz sposób przygotowania danych do tzw. analizy porównawczej. Uzyskane dane przedstawiono w dwóch częściach. Część pierwsza, opisuje badanie wpływu żywienia na profile lipidowe w mięśniach kurcząt broilerów. Część druga, dotyczy wpływu czasu przechowywania tkanki w warunkach chłodniczych na zmiany profili lipidowych w badanych tkankach. Ostatnie dwie części pracy, obejmują jej podsumowanie oraz wnioski wypływające z przeprowadzonych eksperymentów.

Część teoretyczna

1. Podstawy biologiczne

Coraz więcej doniesień naukowych podkreśla znaczenie lipidów w prawidłowym funkcjonowaniu układów biologicznych, ich niezbędny udział w szlakach metabolicznych, jak również rolę związków lipidowych w powstawaniu patologii i chorób. Zamieszczony opis lipidów zawiera podstawowe i konieczne informacje, uzasadniające podjęcie badań tej grupy cząsteczek biologicznych. Tekst rozdziału uświadamia, z jak szerokim spektrum zagadnień i problemów można się spotkać przy charakterystyce każdej kategorii lipidów z osobna.

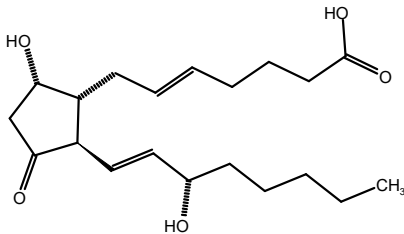
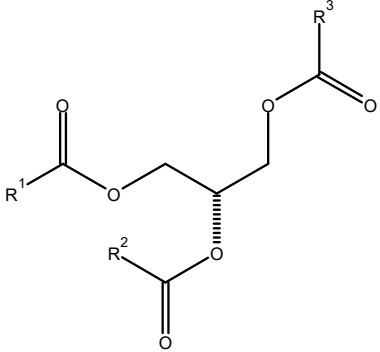
1.1. Definicja i klasyfikacja lipidów

Nie istnieje uniwersalna a zarazem precyzyjna definicja obejmująca wszystkie związki lipidowe [1]. Ogólnie, jest to zróżnicowana grupa naturalnie występujących związków biologicznych nierozpuszczalnych w wodzie, a rozpuszczalnych w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych, tj. chloroform, węglowodory, alkohole, estry i eter [2-5]. Głównym budulcem lipidów są atomy węgla, wodoru, tlenu, jak również azotu, fosforu i siarki [6]. Przez długi czas pracowano nad prawidłową klasyfikacją uwzględniającą wszystkie lipidy występujące w naturze. Związki lipidowe można pogrupować w oparciu o kilka głównych schematów klasyfikacji. Kryterium klasyfikacji mogą być właściwości fizyczne (podane dla temperatury pokojowej), właściwości użytkowe dla człowieka, polarność lub struktura tych związków. W wielu istniejących źródłach istnieje podział lipidów na „proste” i „złożone” [7, 8]. Lipidy proste to takie, które w wyniku hydrolizy rozpadają się na dwa główne produkty. Do tej grupy należą np. acyloglicerole zwane potocznie glicerydami. Jeżeli w wyniku hydrolizy otrzymuje się więcej niż dwa główne produkty, to lipidy takie należą do grupy złożonych. Jako przykład tej grupy można podać glicerofosfolipidy.

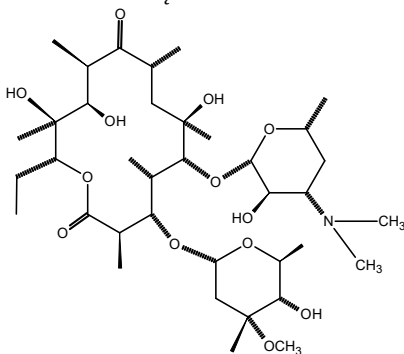
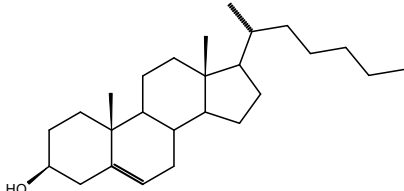
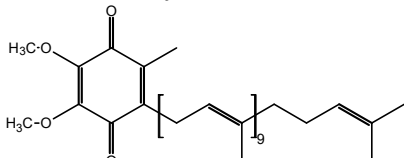
W wyniku ogromnego rozwoju dziedziny nauki zajmującej się badaniem lipidów w systemach biologicznych, nastąpiła konieczność stworzenia nowego systemu klasyfikacji. Z inicjatywy LIPID MAPS oraz Międzynarodowego Komitetu Klasyfikacji i Nazewnictwa Lipidów (ILCNC, ang. *International Lipid Classification and Nomenclature Committee*), stworzono osiem kategorii lipidów bazując na danych pochodzących od organizmów eukariotycznych i prokariotycznych [9, 10]. Każda kategoria posiada odrębną hierarchię uporządkowaną w podkategorie i podgrupy [11, 12]. W ostatnich latach podejmowano wiele prób ujednolicenia nazw lipidów. W konsekwencji, stworzono nomenklaturę powszechnie przyjętą przez komisję nazewnictwa Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) oraz Międzynarodową Unię Biochemii i Biologii Molekularnej (IUBMB, ang. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). W **Tab. 1** przedstawiono schemat

klasyfikacji lipidów i ich pochodnych. Dla każdej kategorii lipidów, według systematyki LIPID MAPS, podano pojedynczy przykład lipidu wraz z jego nazwą zwyczajową (historyczną nazwę lub nomenklaturę najczęściej używaną w literaturze), wzorem związku oraz jego strukturą.

Tab. 1. Klasyfikacja związków lipidowych według systematyki LIPID MAPS wraz z przykładową strukturą związku dla każdej z kategorii

<i>Kategoria</i>	<i>Klasy</i>	<i>Przykład</i>
Kwasy tłuszczowe i ich pochodne	• Kwasy tłuszczowe i koniugaty • Oktadekanoidy • Eikozanoidy • Dokozanoidy • Alkohole tłuszczowe • Aldehydy tłuszczowe • Estry kwasów tłuszczowych • Amidy tłuszczowe • Nitryle tłuszczowe • Etery tłuszczowe • Węglowodory • Węglowodory utlenione • Acylo-glikozydy tłuszczowe • Inne kwasy tłuszczowe	<i>Nazwa zwyczajowa:</i> Prostaglandyna D₂ (PGD₂) <i>Wzór sumaryczny:</i> C₂₀H₃₂O₅ <i>Dokładna masa:</i> 352,465 g/mol <i>Struktura związku:</i> 
Glicerolipidy	• Monoacyloglicerole • Diacyloglicerole (DAG) • Triacyloglicerole (TAG) • Glikozylomonoglicerole • Glikozylodiacyloglicerole • Inne glicerolipidy	<i>Nazwa zwyczajowa:</i> Triacyloglicerol <i>Wzór sumaryczny:</i> C₅₅H₉₈O₆ <i>Dokładna masa:</i> 855,363 g/mol <i>Ogólna struktura związku:</i> 
Glicerofosfolipidy	• Glicerofosfocholina • Glicerofosfoetanolamina • Glicerofosfoseryna • Glicerolfosfoglicerol • Fosforan glicerofosfoglicerolu • Glicerofosfoinozytol • Monofosforan glicerofosfoinozytolu • Bifosforan glicerofosfoinozytolu • Trifosforan glicerofosfoinozytolu • Glicerofosforany	<i>Nazwa zwyczajowa:</i> Fosfatydyloinozytol <i>Wzór sumaryczny:</i> C₄₇H₈₃O₁₃P <i>Dokładna masa:</i> 886,560 g/mol

	• Gliceropirofosforany • Glicerofosfoglycerofosfoglicerol • CDP-glicerole • Glikozyloweglicerofosfolipidy • Glicerofosfoinozytoglikany • Glicerofosfonocholina • Glicerofosfonoetanolamina • Inne glicerofosfolipidy	<i>Ogólna struktura związku:</i>
Sfingolipidy	• Zasady sfingoidowe • Ceramidy • Fosfosfingolipidy • Fosfonosfingolipidy • Neutralne glikosfingolipidy • Kwasowe glikosfingolipidy • Podstawowe glikosfingolipidy • Amfoteryczne glikosfingolipidy • Inne sfingolipidy	<i>Nazwa zwyczajowa:</i> Sfingomielina C12 <i>Wzór sumaryczny:</i> $C_{35}H_{75}N_2O_6P$ <i>Dokładna masa:</i> 650,954 g/mol <i>Ogólna struktura związku:</i>
Sacharolipidy	• Acetylowana glukozamina • Glikany acetylowanej glukozaminy • Acetylowana trehaloza • Glikany acetylowanej trehalozy • Pozostałe acylowane cukry • Inne sacharolipidy	<i>Nazwa zwyczajowa:</i> Lipid X <i>Wzór sumaryczny:</i> $C_{34}H_{66}NO_{12}P$ <i>Dokładna masa:</i> 711,432 g/mol <i>Struktura związku:</i>
Poliketydy	• Poliketydy liniowe • Acetogeniny chlorowcowane • Tetracykliny liniowe • Polieny • Antybiotyki polieteroimidowe • Aflatoksyny i substancje pokrewne • Flawonoidy • Poliketydy aromatyczne • Nie-rybosomalne peptydy • Inne poliketydy	<i>Nazwa zwyczajowa:</i> Erytromycyna <i>Wzór sumaryczny:</i> $C_{37}H_{67}NO_{13}$ <i>Dokładna masa:</i> 733,461 g/mol

		<i>Struktura związku:</i> 
Steroidy	• Sterole • Sterydy • Sekosteroidy • Kwasy żółciowe i pochodne • Koniugaty steroidowe • Inne steroidy	<i>Nazwa zwyczajowa:</i> Cholesterol <i>Wzór sumaryczny:</i> $C_{27}H_{46}O$ <i>Dokładna masa:</i> 386,355 g/mol <i>Struktura związku:</i> 
Prenole	• Izoprenoidy • Chinony i hydrochinony • Polipreny • Hopanoidy • Inne prenole	<i>Nazwa zwyczajowa:</i> Koenzym Q10 <i>Wzór sumaryczny:</i> $C_{59}H_{90}O_4$ <i>Dokładna masa:</i> 862,684 g/mol <i>Struktura związku:</i> 

1.2. Podstawowe funkcje lipidów

W skład każdej komórki eukariotycznej wchodzi tysiące różnych rodzajów lipidów [13]. W konsekwencji, ta grupa związków jest odpowiedzialna za szereg kluczowych i różnorodnych funkcji. Lipidy pełnią rolę magazynu skondensowanej, komórkowej energii w postaci triacylogliceroli, są także prekursorem dla wielu cząsteczek sygnałowych, a same pełnią również znaczącą rolę w komunikacji międzykomórkowej jako pierwsze i wtórne przekaźniki sygnałów [14-17]. Tłuszcze pełnią funkcję izolacyjną i ochronną, zarówno u roślin, jak i u zwierząt [14]. Płaszcz lipidowy skóry zwierząt tworzy barierę przyczyniając się do utrzymania homeostazy, w tym ochrony przed stanami zapalnymi, jak również uczestnicząc w odpowiedzi immunologicznej [18, 19]. Lipidy są podstawowym budulcem błon

biologicznych otaczających komórki, a także znajdujących się wewnątrz nich. To dzięki tej grupie związków błona zyskuje swoje podstawowe właściwości fizyczne i chemiczne [20]. Występowanie prawidłowych proporcji tłuszczu w strukturze błon plazmatycznych, uważa się za istotny parametr w fizjologicznym metabolizmie układów biologicznych. Patologiczny skład lipidowy membran implikuje wiele chorób związanych z zespołami metabolicznymi oraz chorobami o podłożu neurologicznym. Dwuwarstwa lipidowa stanowi istotę struktury błony komórkowej, a wchodzące w jej skład lipidy mają charakter amfipatyczny [21]. Czynniki strukturalne dzieli lipidy wchodzące w skład błony lipidowej na trzy główne grupy: glicerolipidy, sfingolipidy i sterole [22].

Potwierdzeniem dużego znaczenia lipidów w naukach biologicznych jest utworzenie nowej gałęzi nauki, zwanej lipidomiki. Obejmuje ona wszelkie zagadnienia dotyczące lipidów [1, 23]. Lipidomika obejmuje badanie poziomów lipidowych w systemach biologicznych, w tym pełnej charakterystyki lipidowych składników molekularnych, określenia ich biologicznych funkcji wraz z genami i białkami zaangażowanymi w metabolizm lipidów [24-26]. Ten stosunkowo nowy obszar badań jest wzbogacany o informacje otrzymywane z nowoczesnych technik badawczych, wywodzących się z fizyki eksperymentalnej, takich jak spektrometria masowa, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *Nuclear Magnetic Resonance*), czy też spektroskopia fluorescencyjna [26-29]. Coraz większą uwagę skupia się na zagadnieniu wpływu poziomu poszczególnych lipidów jako czynnika implikującego i regulującego rozwój wielu chorób, takich jak otyłość, choroby układu krążenia oraz niektóre postaci nowotworów [30, 31]. Z przedstawionych powyżej powodów, lipidy stanowią niezwykle istotny składnik diety, mający duży wpływ na stan zdrowia organizmów żywych. Co więcej, wiele z nich jest koniecznych do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego. Przykładem mogą być niektóre kwasy tłuszczowe (np. kwas linolowy ω -6 i kwas α -linolenowy ω -3), które nie są syntetyzowane w organizmie ludzkim. Równocześnie, stan podwyższonego poziomu niektórych lipidów we krwi (m.in. cholesterolu oraz niektórych nasyconych kwasów tłuszczowych) jest przyczyną rozwoju wielu chorób układu krwionośnego. Warto bardziej szczegółowo przyjrzeć się każdej kategorii lipidowej z osobna, jak zaprezentowano w tekście poniżej. W opisie pominięto dwie kategorie lipidów, sacharolipidy oraz poliketydy. Te dwie kategorie nie analizowano w prezentowanej pracy.

1.2.1. Kwasy tłuszczowe i ich pochodne

W skład kwasów tłuszczowych wchodzi związek alifatyczny zawierający grupy karboksylowe i łańcuchy węglowodorowe o różnych długościach i różnym stopniu nasycenia. Do tej grupy należą związki o najbardziej zredukowanej formie energii chemicznej, równocześnie są one podstawowym budulcem bardziej złożonych lipidów. Mogą tworzyć estry z glicerolem jako monoacyloglicerole, diacyloglicerole, triacyloglicerole, fosfolipidy i inne. Występując w surowicy krwi, transportowane są w formie niezestryfikowanej, jako wolne kwasy tłuszczowe [32].

Naturalne kwasy tłuszczowe mają prostoliniowe łańcuchy, zazwyczaj o parzystej liczbie atomów węgla (od 4 do 22 atomów). Przyczyną, dla której występuje zawsze parzysta liczba atomów węgla jest substrat używany do ich syntezy. Substratem tym, jest dwuwęglowy prekursor acetylo-CoA. W naturalnych produktach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, a także uzyskiwanych z grzybów i bakterii, zidentyfikowano ponad 1000 kwasów tłuszczowych. Jedynie około 50 z nich jest powszechnie badanych i analizowanych, gdyż ta niewielka część występuje najczęściej wśród organizmów żywych.

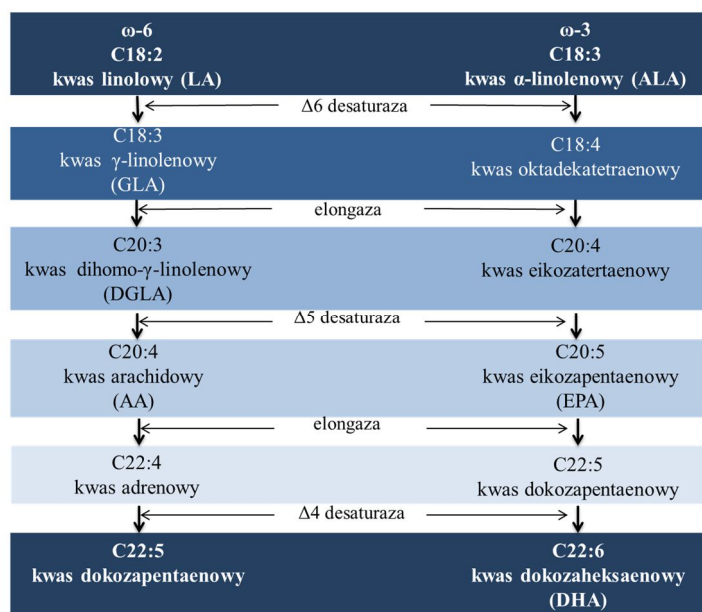
Związki z tej grupy mogą występować w formie nasyconej (SAFA, ang. *Saturated Fatty Acids*), zawierającej jedynie wiązania pojedyncze w łańcuchu acylowym oraz w formie nienasyconej (PUFA, ang. *Polyunsaturated Fatty Acids*). Kwasy tłuszczowe jednonienasycone, czyli monoenowe (MUFA, ang. *Monounsaturated Fatty Acids*), zawierają w swej strukturze jedno wiązanie podwójne, najczęściej w konfiguracji Z (*cis*), natomiast wielonienasycone, polienowe PUFA posiadają dwa lub więcej wiązań podwójnych, przeważnie o konfiguracji Z oddzielonych grupą metylową [33]. Podwójne wiązanie w nienasyconych kwasach tłuszczowych usztywnia ich konformację, a w przypadku izomeru *cis*, powoduje wygięcie łańcucha, tym samym ogranicza swobodę konformacyjną kwasu tłuszczowego [34]. Różnorodność molekularna tej grupy wynika z długości łańcucha, z położenia wiązania podwójnego w łańcuchu alifatycznym, z konformacji izomeru *cis-trans* oraz z obecności grup funkcyjnych [34].

Systematyczne nazwy kwasów tłuszczowych przeważnie są zbyt uciążliwe dla powszechnego użytku. Stosowane są alternatywne, krótsze nazwy zwyczajowe. W powszechnym użyciu, kwasy tłuszczowe nazywane są od nazw węglowodorów o tej samej liczbie atomów węgla w cząsteczce przy równoczesnej zamianie końcówki z *-an* na *-owy*. Dla przykładu, od węglowodoru n-heksadekanu stosowana jest nazwa kwasu n-heksadekanowego, którego wzór sumaryczny wygląda następująco $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$. Można, przy podawaniu nazwy kwasu, w skrócie zapisać np. 16:0, gdzie dwie liczby oddzielone dwukropkiem, oznaczają odpowiednio ilość atomów węgla w łańcuchu węglowym oraz liczbę wiązań podwójnych. W przypadku nienasyconych kwasów tłuszczowych stosuje się również opis położenia wiązania podwójnego w łańcuchu, który liczy się od końca metylowego cząsteczki kwasu tłuszczowego. Dla przykładu można podać kwas oleinowy, którego wzór pół-sumaryczny wygląda następująco $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$, jego skrótową nazwę zwyczajową można zapisać na kilka sposobów: 18:1(ω -9), 18:1(*n*9), 18:1(*n*-9). Niektóre z kwasów tłuszczowych dominują w organizmach zwierzęcych, w szczególności kwas palmitynowy C16:0, kwas stearynowy C18:0, kwas oleinowy C18:1, linolowy C18:2, arachidonowy C20:4 oraz dokozaheksaenowy C22:6 [35]. Nazwy typowych kwasów tłuszczowych najczęściej występujących w naturze zostały wymienione w **Tab. 2** [34].

Tab. 2. Kwasy tłuszczowe najczęściej występujące w naturze

Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa	Skrót
Kwasy nasycone:		
<i>n</i> -dodekanowy	laurynowy	12:0
<i>n</i> -tetradekanowy	mirystynowy	14:0
<i>n</i> -heksadekanowy	palmitynowy	16:0
<i>n</i> -oktadekanowy	stearynowy	18:0
<i>n</i> -eikozanowy	arachidowy	20:0
<i>n</i> -dokozaanowy	behenowy	22:0
Kwasy jednonienasycone:		
<i>cis</i> -9-heksadecenowy	palmitoleinowy	16:1(n-7)
<i>cis</i> -6-oktadecenowy	petroselinowy	18:1(n-12)
<i>cis</i> -9-oktadecenowy	oleinowy	18:1(n-9)
<i>cis</i> -11-oktadecenowy	wakcenowy	18:1(n-7)
Kwasy wielonienasycone:		
9,12-oktadekadienowy	linolowy	18:2(n-6)
9,12,15-oktadekatrienowy	α -linolenowy	18:3(n-3)
6,9,12-oktadekatreinowy	γ -linolenowy	18:3(n-6)
5,8,11,14-ejkozaetetraenowy	arachidonowy	20:4(n-6)

Kwasy tłuszczowe PUFA będące długołańcuchowymi, wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, a określane jako niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT) dzielą się na dwie istotne biologicznie rodziny, ω -6 oraz ω -3. Macierzystymi kwasami tłuszczowymi, dla tych dwóch grup, są odpowiednio kwas linolowy (LA, ang. *Linoleic Acid*) oraz kwas α -linolenowy (ALA, ang. *Alpha Lipoic Acid*). Oba macierzyste kwasy tłuszczowe dla rodzin ω -6 oraz ω -3, mają analogiczne ścieżki reakcyjne katalizowane przez te same enzymy, desaturazy ($\Delta 6$, $\Delta 5$ i $\Delta 4$) oraz elongazy [36]. Z substratów w postaci macierzystych kwasów, na skutek stopniowej elongacji oraz desaturacji, powstają nowe kwasy tłuszczowe [34]. Ścieżki biosyntezy dla obu omawianych rodzin kwasów tłuszczowych zostały przedstawione na **Rys. 1**. Wspomniane kwasy są niezwykle istotne z punktu widzenia stosowanej diety, gdyż organizm człowieka i większości zwierząt nie ma zdolności do syntezy wymienionych kwasów z powodu braku wyspecjalizowanych desaturaz [37]. Organizmy te mają jedynie zdolność do ich przebudowy, elongacji łańcucha węglowego i wprowadzania do niego kolejnych wiązań podwójnych [38]. Wspomniane desaturazy wprowadzają wiązanie podwójne w pewnych określonych położeniach łańcucha węglowego, tj. przy węglu 3. i 6. licząc od grupy metylowej (ω -6, ω -3). Kwasy mające taką konformację są syntetyzowane wyłącznie przez rośliny [39].



Rys. 1. Schemat ilustrujący ścieżki biosyntezy polienowych kwasów tłuszczowych z rodziny ω -6 oraz ω -3. Opracowano na podstawie [34].

Szlak metaboliczny NNKT ma miejsce w komórkowym retikulum endoplazmatycznym [40]. Jak wynika z **Rys. 1** kwasy LA i ALA przekształcają się poprzez desaturację, enzymem Δ 6-desaturazą, odpowiednio do kwasu γ -linolenowego (GLA, 18:3) i kwasu oktadekatrienowego (SA, 18:4). Następnie ma miejsce wydłużenie GLA do kwasu dihomo- γ -linonolenowego (DGLA, 20:3), natomiast kwasu SA do kwasu eikozatetraenowego (ETA, 20:4) [41]. Jednym z ważniejszych kwasów z rodziny PUFA jest kwas dokozaheksaenowy (DHA, C22:6). Jest to produkt końcowy łańcucha reakcji kwasów z rodziny ω -3. Konwersja ALA do DHA wymaga wydłużenia i desaturacji łańcucha węglowego. Jedynie ostatni krok wymienionych reakcji wymaga translokacji z retikulum endoplazmatycznego do innego kompartmentu komórkowego, peroksysomu [42]. Bardzo ważnymi produktami przemian enzymatycznych z kwasów dwudziestowęglowych są eikozanoidy, substancje hormonopodobne o szerokim spektrum działania. Udowodniono ich aktywność w reakcjach przeciwzapalnych, np. w przypadku raka wątroby, jelita grubego, tkanki nerwowej oraz wczesnych procesach kariogenezy [43-47]. Do tej grupy związków należą, fizjologicznie i farmakologicznie czynne prostaglandyny, prostacykliny, tromboksany, leukotrieny i lipoksyny [36].

Spożycie i proporcje wielonienasyconych kwasów tłuszczowych mają bardzo duży wpływ na zdrowie ludzkie. W wielu pracach wykazano związek pomiędzy poziomami poszczególnych kwasów z rodziny PUFA a rozwojem poznawczym i motorycznym w pierwszych latach życia człowieka. Co więcej, ich zaburzona gospodarka odgrywa istotną rolę w powstawaniu chorób psychicznych, przyczynia się do śmiertelności w wyniku chorób układu sercowo-naczyniowego, alergii, immunologicznymi i zapalnymi reakcjami organizmu oraz wpływa na poziomy triacylogliceroli [48-53]. Wymienione procesy chorobowe są

bezpośrednio powiązane z długołańcuchowymi PUFA z rodziny ω -6, a więc między innymi z kwasem AA oraz z kwasami z rodziny ω -3, między innymi kwasem eikozapentaenowym oraz kwasem dekozaheksaenowym.

1.2.2. Glicerolipidy

Glicerolipidy, zwane również glikolipidami, są składnikami błon biologicznych i występują w większości organizmów, w bakteriach, roślinach i zwierzętach. Związki chemiczne należące do tej grupy składają się z części lipidowej, którą tworzą głównie kwasy tłuszczowe, z przyłączoną do niej częścią cukrową będącą przeważnie glicerolem [34, 54]. Poza tą grupą celowo wyodrębniono glicerofosfolipidy, jako odrębną kategorię, ze względu na jej powszechne występowanie w wielu strukturach oraz istotne znaczenie w składzie błony komórkowej. [11]. Ogólnie mówiąc, glikolipidy, są to cząsteczki amfifilowe, w których skład wchodzi hydrofilowa grupa główna i niepolarny, hydrofobowy łańcuch węglowy. Ze względu na swą budowę glikolipidy mają tendencję do aglomeracji klastrowej w środowisku wodnym w struktury dwuwarstw lipidowych [55]. Grupa glikolipidów jest w głównej mierze zdominowana przez mono-, di- i tri- acyloglicerole, a więc glicerole zestryfikowane przez jeden, dwa lub trzy kwasy tłuszczowe [56, 57]. Wyszczególnione podklasy tej kategorii są reprezentowane przez gliceroglikany, zawierające jedną lub więcej reszt cukrowych przyłączonych do glicerolu poprzez wiązanie glikozydowe [58]. Glikolipidy najczęściej funkcjonują w błonach biologicznych jako stabilizatory usztywniające powierzchnię błony komórkowej [59]. Ponadto, pełnią ważną rolę w wielu różnych procesach biologicznych. Na przykład, uczestniczą w fotosyntetycznym transporcie elektronów w roślinach oraz w komunikacji międzykomórkowej, modulacji receptorów oraz transdukcji sygnału w organizmach zwierzęcych [60].

Acyloglicerole są głównymi składnikami tłuszczów zapasowych [6]. Triacyloglicerole (TAG), nazywane również trójglicerydami, znacznie przeważają ilościowo nad diacyloglicerolami (DAG) i monoacyloglicerolami [61]. Mogą one występować w formie prostej, zawierając jeden rodzaj kwasu tłuszczowego we wszystkich trzech pozycjach glicerolu, lub w postaci mieszanej, w której posiadają dwa lub trzy różne kwasy tłuszczowe. Ich biosynteza pokrywa się częściowo z syntezą glicerofosfolipidów (patrz: następny podrozdział) [14]. W przypadku naturalnych tłuszczów TAG tworzą złożone mieszaniny triacylogliceroli prostych i mieszanych [6].

1.2.3. Glicerofosfolipidy

Glicerofosfolipidy, określane także jako fosfolipidy, stanowią liczną grupę polarnych związków chemicznych wszechobecnych w przyrodzie, występujących we wszystkich organizmach żywych, zwierzęcych i roślinnych. Każdy fosfolipid złożony jest z czterech jednostek. Jest on pochodną kwasu fosfatydylowego,

którego rdzeniem jest cząsteczka glicerolu zestryfikowana dwoma długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi i kwasem fosforowym [6]. Tak samo jak glikolipidy, glicerofosfolipidy są cząsteczkami amfifilowymi. Ich reszty kwasowe mają charakter hydrofobowy, a grupa fosforanowa jest polarna. Właściwości tej grupy lipidowej są konsekwencją cech reszt kwasów tłuszczowych o długich łańcuchach, a ich polarność związana jest z obecnością zjonizowanego fosforanu i grupy bazowej [8]. Ze względu na właściwości fizyczne, glicerofosfolipidy plasują się pomiędzy całkowicie nierozpuszczalnymi w wodzie neutralnymi lipidami, a związkami chemicznymi tworzącymi rzeczywiste roztwory. Glicerofosfolipidy mogą być syntetyzowane według różnych procedur. Jednym ze sposobów jest synteza *de novo* z kwasu fosfatydowego i cytydynotrifosforanu (CTP) [14].

Fosfolipidy występują we wszystkich komórkowych strukturach błonowych zapewniając ich integralność i funkcjonalność [34, 62]. Błony plazmatyczne zbudowane są z podwójnej warstwy fosfolipidowej, gdzie hydrofobowe ogonki skierowane są do wnętrza, natomiast hydrofilowe głowy wystają na zewnątrz błony [8]. Do przykładowych glicerofosfolipidów obecnych w błonach komórkowych należą między innymi fosfatydylocholina (PC), znana również pod nazwą lecytyny, fosfatydyloetanolamina (PE), fosfatydyloinozytol (PI) oraz fosfatydyloseryna (PS) [22]. Błony charakteryzują się asymetrycznością pod względem rozmieszczenia różnych typów fosfolipidów. Przykładowo, PC znajduje się głównie w zewnętrznej warstwie błony, natomiast warstwa skierowana do cytozolu w swoim składzie zawiera głównie PS i PE. Coraz więcej badań wykazuje, że właśnie asymetria w rozmieszczeniu poszczególnych fosfolipidów w błonie może odgrywać kluczową rolę w wielu ważnych procesach biologicznych i komórkowych, tj. fuzja komórek, aktywacja kaskady krzepnięcia krwi, czy też usuwanie apoptycznych komórek przez makrofagi [63]. Glicerofosfolipidy są kluczowymi związkami biorącymi udział w regulacji podstawowych procesów biologicznych jako cząsteczki sygnałacyjne [20]. Ponadto, fosfolipidy wchodziły w skład lipoprotein, kompleksów żółciowych oraz surfaktantów płucnych [64-66].

1.2.4. Sfingolipidy

Sfingolipidy tworzą liczną grupę związków mających wspólną cechę strukturalną jaką jest wielowęglowodorowy szkielet będący nienasyconym aminoalkoholem, sfingozyną [67]. Jedną z dróg biosyntezy lipidów należących do tej grupy jest biosynteza *de novo* z seryny i z długołańcuchowych kwasów acylo-CoA. Powstałe w wyniku biosyntezy lipidy są następnie przekształcane poprzez przyłączenie różnego typu związków w ceramidy, fosfosfingolipidy lub glikosfingolipidy [68]. Na przykład, ceramidy, bioaktywne związki o dużym znaczeniu w procesach fizjologicznych i biologicznych, powstają po przyłączeniu kwasów tłuszczowych do sfingozynowego szkieletu. Stają się w ten sposób prekursorami bardziej złożonych sfingolipidów [69]. Analogicznie do glikolipidów i fosfolipidów, cząsteczki sfingolipidów mają charakter amfipatyczny, a ich

cyldryczny kształt generuje formowanie dwuwarstwy lipidowej w środowisku wodnym. Występuje kilka klas sfingolipidów: wymieniona wcześniej klasa ceramidów, zasady sfingoidowe, sfingomieliny powstające przez estryfikację grupy hydroksylowej ceramidu fosforanem choliny lub fosforanem etanoloaminy, czy też bardziej złożone glikosfingolipidy lub gangliozydy [6].

Sfingolipidy pełnią kilka kluczowych funkcji w układach biologicznych. Przede wszystkim, są elementami składowymi błon biologicznych obok fosfolipidów, glikolipidów i steroidów. Ich zawartość w błonach mieści się w zakresie od 2% do 15% w zależności od badanej tkanki [70, 71]. Obecność tej grupy lipidowej jest rejestrowana głównie na zewnętrznej stronie błon plazmatycznych komórki, gdzie mogą inicjować liczne procesy i wywierać wpływ na proliferację, różnicowanie oraz programowaną śmierć komórek. Jako cząsteczki biologiczne mają zdolność aktywowania określonych białek enzymatycznych, np. swoistą błonową kinazę białkową (CAPK, ang. *Protein Kinase C*) [72]. Tworzą także mielinę, a więc wyspecjalizowaną otoczkę aksonów komórek nerwowych, która przyspiesza przekaz impulsu nerwowego [68, 73].

1.2.5. Steroidy

Steroidy, których przykładem jest cholesterol i jego pochodne, są istotnymi składnikami lipidów błonowych. Lipidy te, powszechnie zwane również sterolami, posiadają wspólny wielopierścieniowy element strukturalny zwany steranem, który poprzez swoją budowę determinuje sztywność molekuly. Steran zbudowany jest z czterech połączonych ze sobą pierścieni węglowych, tworząc rdzeń cząsteczki, do którego z jednej strony przyłączona jest np. grupa hydroksylowa o charakterze hydrofilowym, a z drugiej strony długołańcuchowy kwas tłuszczowy [14, 32]. Różnice strukturalne między steroidami dotyczą zazwyczaj zmian w ilości i rodzaju podstawników oraz położenia wiązań podwójnych. Z biologicznego punktu widzenia, ważnymi steroidami są sterole, kwasy żółciowe i hormony steroidowe.

Cholesterol jest jednym z najważniejszych steroli zwierzęcych. W organizmie zwierzęcym cholesterol może być syntetyzowany *de novo*, głównie w wątrobie lub mieć pochodzenie egzogenne, z pokarmu [74]. Produkowany jest w organizmie z acetylo-CoA poprzez wiele etapów biochemicznych procesów zachodzących w retikulum endoplazmatycznym, a jego produkcja jest kontrolowana przez regulację reduktazy HMG-CoA. Z kolei, aktywność tej ostatniej jest regulowana poziomem cholesterolu egzogenne [32, 75]. Duże znaczenie cholesterolu wynika z wielu czynników. Po pierwsze, jest to składnik zewnętrznych błon plazmatycznych oraz błon organelli komórkowych, który ogranicza ruchy boczne i moduluje dyfuzję boczną lipidów [76-78]. W cytoplazmie komórek jest obecny w formie zestryfikowanej z kwasami tłuszczowymi. Jest prekursorem dla wielu cząsteczek sygnałowych i bierze czynny udział w szlakach transdukcji sygnału [79-81]. Cholesterol towarzyszy w procesach regulujących tworzenie synaps [82, 83], jest również substratem dla wielu hormonów

steroidowych, tj. progesteron, testosteron, kortyzol, witaminy D i soli żółciowych [14, 74]. Średnie wartości cholesterolu pochodzenia egzogenego, dla człowieka, to 0,5-1 g/dzień, zaś endogenego 2-2,5 g/dzień (np. żółć wydzielana przez wątrobę) [83]. Nadmierna obecność cholesterolu w ludzkiej surowicy krwi zwiększa ryzyko zawału serca na skutek odkładania się tego tłuszczu w ścianach naczyń krwionośnych (zmiany miażdżycowe). Jest to efekt nieprawidłowego funkcjonowania mechanizmu wychwytu cholesterolu przez jego główny nośnik - lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL, ang. *Low Density Lipoprotein*), które są potocznie określane jako zły cholesterol. Wyróżnia się także lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL, ang. *High Density Lipoprotein*), tzw. dobry cholesterol, które zapobiegają odkładaniu się cholesterolu w naczyniach tętniczych [8, 84]. Cholesterol jest powszechnie występującym tłuszczem w produktach zwierzęcych, w tym przede wszystkim w mięsie.

1.2.6. Prenole

Związki należące do grupy prenoli są syntetyzowane z pięciowęglowych prekursorów, takich jak difosforan izopentenylu i difosforan dimetyloallilu, głównie poprzez reakcje kwasu mewalonowego (MVA) [85]. W reakcji dołączania do substratu kolejnych grup pięciowęglowych, a więc jednostek izoprenowych, powstają proste izoprenoidy. Do grupy izoprenoidów zalicza się terpenoidy, karotenoidy oraz kauczuk. Ich klasyfikacja opiera się na ilości jednostek izoprenowych wchodzących w skład związku. Związki zawierające powyżej 40 atomów węgla noszą nazwę politerpeny. Ważną grupą izoprenoidów, występujących w dużej mierze w roślinach, są karotenoidy. Charakteryzują się one silną absorpcją światła, odznaczają się specyficzną barwą (żółtą, pomarańczową lub czerwoną), wykazują właściwości przeciwutleniające oraz pełnią rolę prekursorów witaminy A. Kolejną biologicznie ważną klasą molekuł, należącą do grupy prenoli są chinony i hydrochinony, do których należą witaminy E i K, jak również ubichinon.

Nazwa witamina E, określa całą rodzinę organicznych związków chemicznych, w której skład wchodzi rozpuszczalne w tłuszczach tokoferole i tokotrienole. W organizmie ludzkim najczęściej występujący i najistotniejszy jest α -tokoferol [8]. Pełni funkcję witaminy, która jest głównym antyoksydantem występującym w komórkach, choć najnowsze badania wskazują na istnienie również innych, utleniających właściwości tego związku [86].

Zadaniem witaminy E jest między innymi hamowanie utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych i witaminy A, dostarczanie składników odżywczych do komórek, wzmacnianie ścian naczyń krwionośnych, czy też ochrona erytrocytów przed przedwczesnym rozpadem [8]. Między innymi udowodniono, że wzbogacenie diety w witaminę E spowalnia chorobę Alzheimera [87]. Natomiast skutkiem jej niedoboru może być wzrost katabolizmu nienasyconych kwasów tłuszczowych, co w konsekwencji powoduje zaburzenie

prawidłowego funkcjonowania błon komórkowych prowadząc do spowolnienia transportu aksonalnego, dystrofii i pęcznienia aksonów [8, 88].

1.2.7. Tkanka mięśniowa i tłuszczowa

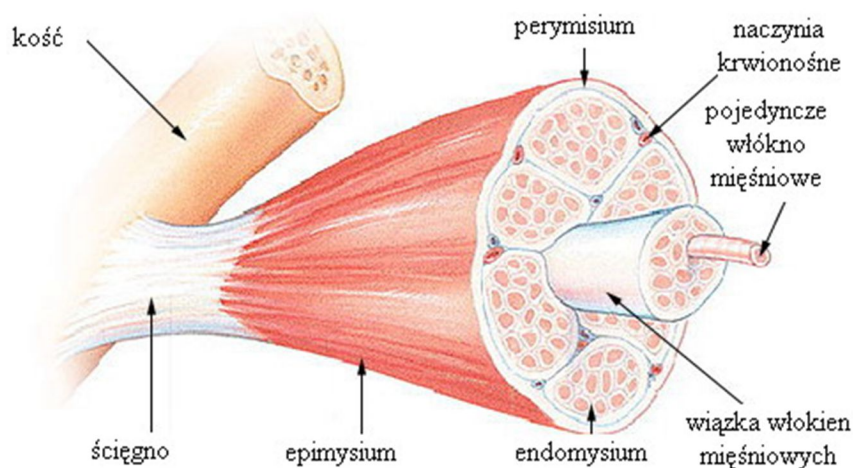
Układami biologicznymi, badanymi w prezentowanej pracy i zawierającymi związki lipidowe omówione w poprzednim rozdziale, są tkanka mięśniowa poprzecznie prążkowana szkieletowa oraz tkanka tłuszczowa. Tkanki te, pochodzą z mięśni piersiowych powierzchniowych (*m. pectoralis superficialis*) kurcząt brojlerów Ross 308. Schemat budowy mięśnia poprzecznie prążkowanego szkieletowego przedstawiono na **Rys. 2**.

Mięśnie szkieletowe są wysoce zorganizowaną strukturą wykazującą możliwość wykonywania skurczu oraz generowania siły mięśniowej [89]. Ten rodzaj mięśni jest głównym elementem lokomocyjnym, a także podporowym organizmu. Mięśnie stanowią centra zasadniczych przemian metabolicznych, w wyniku których powstają liczne związki chemiczne oraz energia uwalniana w postaci ciepła [90]. Czynność skurczowa mięśni wyzwalana jest impulsem nerwowym. Cechą charakteryzującą i wyróżniającą mięśnie szkieletowe poprzecznie prążkowane jest regularne ułożenie włókien mięśniowych oraz białek kurczliwych. W konsekwencji, widoczne jest wyraźne prążkowanie włókien. Ruchy tego typu mięśni mają charakter warunkowy, co oznacza, iż występują dopiero po analizie danego bodźca przez ośrodek kojarzenia w mózgowiu, głównie w pniu mózgu. Wynika to również z faktu, iż unerwione są one przez neurony należące do ośrodkowego układu nerwowego, zwanymi motoneuronami α [90]. Włókna mięśni szkieletowych uporządkowane są w pęczki. W każdej wiązce znajduje się od kilku do nawet kilkuset włókien scalanych są ze sobą poprzez obecną w mięśniach tkankę łączną tworzącą zrąb łącznotkankowy mięśni (IMCT, ang. *Intramuscular Connective Tissue*). IMCT pełni wiele funkcji w strukturze mięśnia m.in. łączy i zespolą poszczególne włókna mięśniowe w jednolitą całość. Chroni pracujący mięsień przed odkształceniem włókien mięśniowych w czasie skurczu, ułatwiając tym samym ich pracę, a także stanowi rusztowanie dla przebiegających w nim naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz nerwów. Jest również miejscem odkładania się tkanki tłuszczowej. Zrąb łącznotkankowy mięśni utworzony jest z włókien kolagenowych, włókien elastycznych, proteoglikanów i glikoprotein [91]. W mięśniach szkieletowych tkanka łączna ma budowę hierarchiczną. Jak pokazano na **Rys. 2** tworzą ją trzy struktury, tzw. domeny:

Endomysium – śródmięsna, tworzy warstwę otaczającą pojedyncze włókno mięśniowe, zbudowana jest z cienkich włókien kolagenowych.

Perimysium – omięsna, stanowi osłonę zbudowaną z tkanki łącznej, która otacza pęczki włókien mięśniowych. Utworzona jest ona z włókien sprężystych oraz kolagenowych.

Epimysium – namięsna, zbudowana z tkanki łącznej utworzonej głównie z włókien kolagenowych zanurzonych w macierzy podstawowej, której głównym składnikiem są proteoglikany. Stanowi ona zewnętrzną osłonę mięśni [92].



Rys. 2. Schemat budowy mięśnia poprzecznie prążkowanego szkieletowego (wg. web-books – eLibrary – Medicine, zmienione).

Struktura, skład i ilość tkanki łącznej w mięśniu szkieletowym uzależnione są od rodzaju mięśnia, gatunku, rasy, płci, a także wieku badanego zwierzęcia. W każdym przypadku struktura ta ma znaczący wpływ na efekt końcowy jakim jest produkt kupowany przez konsumenta. Nawet niewielkiej zmianie morfologii lub składu IMCT towarzyszy nieproporcjonalnie duża zmiana w parametrach określających teksturę badanego mięsa.

Pojedyncze włókno mięśniowe poprzecznie prążkowane (miocyt) stanowi tzw. *syncytium* powstałe na skutek zespolenia mioblastów (komórek macierzystych) o cylindrycznym, wydłużonym kształcie. W skład pojedynczego włókna mięśniowego wchodzi: sarkolemma – cienka błona plazmatyczna otaczająca włókno od zewnątrz, liczne, owalne jądra ułożone na obwodzie włókna pod skarkolemmą, sarkoplazma, w której znajdują się organelle komórkowe takie jak aparat Golgiego, mitochondria, sarkosomy, kropelki tłuszczu, ziarenka glikogenu, siateczka sarkoplazmatyczna oraz włókienka mięśniowe zwane miofibrilami [93]. W obrazach z mikroskopu elektronowego miofibryle wykazują poprzeczne prążkowanie wynikające z naprzemiennego występowania prążków ciemnych (prążków *A*-anizotropowych, dwułamnych w świetle spolaryzowanym) oraz jasnych (prążków *I*-izotropowych, niezałamujących światła spolaryzowanego). Taki układ odpowiada ułożeniu miozynowych i aktynowych filamentów włókienek kurczliwych (miofilamentów), które na poziomie ultrastrukturalnym utrzymywane są w swoim położeniu przez płytki zbudowane z dodatkowych białek. Uwidacznia się to w postaci tzw. *linii Z* na obrazach mikroskopowych, dzielących miofibryle na jednostki czynnościowe nazwane sarkomerami lub miomami.

Ważną rolę w kształtowaniu parametrów jakościowych mięsa odgrywa tłuszcz śródmięśniowy. Ilość i rozmieszczenie powstałej tkanki tłuszczowej implikuje przydatność technologiczną i kulinarną mięsa. Badania wykazały pozytywny wpływ tłuszczu śródmięśniowego na takie cechy mięsa gotowanego jak: kruchość, soczystość, smak oraz jakość ogólną mięsa. W obrębie mięśni,

tłuszcz śródmięśniowy zmagazynowany jest w postaci adipocytów występujących pomiędzy pęczkami włókien mięśniowych, pomiędzy włóknami mięśniowymi oraz w postaci drobnych kropli tłuszczowych rozproszonych w miofibrylarnej cytoplazmie [94, 95]. Zapasy tłuszczu śródmięśniowego służą jako główny rezerwuuar energii dla mięśni szkieletowych [96]. Zawartość tłuszczu śródmięśniowego stanowi często odrębny w stosunku do pozostałych parametrów wyznaczających jakość mięsa, cel hodowlany. Fakt ten, znajduje swoje odzwierciedlenie w wielu nowoczesnych programach hodowlanych, które obok dążenia do poprawy mięsności tusz, coraz większą uwagę skupiają na zapewnieniu odpowiedniego poziomu tłuszczu śródmięśniowego.

Lipidy, w organizmie brojlerów, są przede wszystkim źródłem tłuszczu zapasowego oraz głównym składnikiem błon komórkowych. Istnieje kilka podstawowych czynników indukujących odtłuszczenie drobiu, są nimi: wiek, płeć, genotyp, warunki środowiskowe odchovu oraz żywienie [97]. Kurczęta brojlery zawierają od 2% do 5% tłuszczu wewnętrznego w stosunku do masy ciała ptaków przed ubojem. Lipidy mięsa drobiu to w większości mieszanina triacylogliceroli, fosfolipidów i cholesterolu [98].

1.2.8. Wpływ żywienia zwierząt na profile lipidowe

Odpowiednia i zbilansowana dieta człowieka oznacza całkowite pokrycie zapotrzebowania energetycznego organizmu oraz dostarczenie wszystkich składników pokarmowych niezbędnych do rozwoju i zachowania zdrowia. Dotychczasowe wyniki badań wykazują ścisłą zależność między składnikami odżywczymi zawartymi w spożywanych produktach, a stanem zdrowia organizmu. Jest to, między innymi powód, dla którego na przestrzeni ostatnich lat wzrosło zainteresowanie konsumentów pożywieniem o małej zawartości cholesterolu i równocześnie jak największej ilości niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT). Fakt ten, stanowi równocześnie motywację do badań nad intencjonalną modyfikacją poziomów np. kwasów tłuszczowych w dostarczonym pożywieniu, a więc nad poszukiwaniem tzw. żywności funkcjonalnej. Dotyczy to szczególnie odpowiedniego doboru stosunku kwasów ω -6/ ω -3. Możliwym sposobem regulacji tego doboru jest podawanie olejów roślinnych, zawierających kwasy linolenowy i linolowy.

Mięso w diecie człowieka jest źródłem cennego składu aminokwasowego, a więc cennego białka, dobrze przyswajalnego żelaza niezbędnego w syntezie hemoglobiny, jak również cynku, selenu i miedzi. Dostarcza ono również witaminy z grupy B (B_3 , B_6 oraz B_{12}), związki bioaktywne, takie jak tauryna, karnozyna (posiadająca właściwości przeciwutleniające), ubiquinon oraz kreatynina [99-101]. Równocześnie, mięso jest jednym z głównych źródeł nasyconych kwasów tłuszczowych, o wspomnianym już negatywnym działaniu na organizm ludzki [102].

Mięso drobiowe jest jednym z najpopularniejszych mięs, a jego spożycie w krajach rozwiniętych cały czas rośnie. Unijna produkcja mięsa drobiowego

w 2016 roku wyniosła 14,38 mln ton i była wyższa niż rok wcześniej o 4,4%, przy czym największy wzrost odnotowano w Polsce (wzrost o około 13%), kraju będącym największym producentem mięsa drobiowego w Unii Europejskiej [103]. Ogólne spożycie mięsa drobiowego stanowi około 27,3% wszystkich spożywanych mięs, a jego największe spożycie występuje w grupie emerytów i rencistów [104]. W Polsce, spożycie mięsa drobiowego na przestrzeni 20 lat wzrosło z poziomu 7,6 kg/osobę/rok do 26 kg/osobę/rok, co oznacza wzrost o około 250% [105]. Ogólny wzrost spożycia mięsa różnego typu jest bezpośrednio kojarzony z występowaniem wielu chorób [106, 107]. Przykładowo, choroba niedokrwienna serca oraz miażdżyca, będące najczęstszymi przyczynami zgonu, są silnie skorelowane ze spożyciem cholesterolu oraz kwasów tłuszczowych pochodzenia zwierzęcego w diecie [108]. Ilość spożywanych tłuszczów może pośrednio wpływać na nieprawidłowości w przebiegu procesów zapalnych oraz doprowadzić do rozwoju chorób, takich jak rak lub Alzheimer [53, 109, 110]. Te cywilizacyjne choroby są jedną z przyczyn intensywnych badań nad poziomami kwasów tłuszczowych tkanki mięśniowej różnego pochodzenia, jak również nad sposobami udoskonalania procesów hodowlanych zwierząt, celem znalezienia procedur produkcji zdrowszego mięsa, a więc m.in. o wysokiej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych PUFA [111, 112]

Odpowiedni poziom kwasów tłuszczowych ω -3 w diecie, a w konsekwencji zbilansowany stosunek egzogennych kwasów tłuszczowych ω -6/ ω -3, jak również prawidłowy stosunek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do nasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA/SFA), może skutkować zmniejszeniem ryzyka występowania wymienionych wyżej chorób czy też chorób immunologicznych [113-115]. Z punktu widzenia konsumenta oraz walorów smakowych, zawartość kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej jest również bardzo ważna, gdyż poziom tych kwasów definiują smak mięsa [116]. Zmiana profilu lipidowego, a w szczególności zmiana poziomów wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, powoduje zmianę stabilności oksydacyjnej tkanki mięśniowej podczas jej długoterminowego przechowywania lub gotowania. Nienasycone kwasy tłuszczowe w szybszym stopniu podlegają samorzutnemu utlenianiu niż kwasy nasycone [117]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku mięsa drobiowego, które cechuje największy poziom długołańcuchowych, nienasyconych kwasów tłuszczowych w stosunku do innych gatunków mięs [118, 119]. W tym przypadku, wysoki poziom długołańcuchowych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych zmniejsza odporność na utlenianie, co negatywnie wpływa na smak później przetworzonego mięsa [112, 120].

Mieszanki paszowe w swym składzie mają określoną, zbilansowaną zawartość składników pokarmowych dostosowaną do określonych cech, takich jak gatunek, tempo wzrostu i długość okresu produkcji [121]. Konieczne jest ścisłe przestrzeganie niezbędnych ilości makro- i mikroelementów wraz z ich energetycznymi wartościami [122]. Zależność jakości mięsa od składu podawanej paszy jest przedmiotem wielu badań, a ich głównym celem jest uzyskanie statusu

mięsa jako żywności funkcjonalnej. Przykładem takich badań może być regulowanie składu lipidowego mięsa broilerów, poprzez suplementację codziennej diety kwasami linolowym i linolenowym. Koncentrując się na suplementach zastosowanych w eksperymentach opisywanych w niniejszej pracy, warto zwrócić uwagę na skład tłuszczowy oleju lnianego oraz sojowego. Olej lniany, w swoim składzie ma około 57% kwasu α -linolenowego z rodziny ω -3, 15,82% kwasu linolowego (ω -6), około 15% kwasu oleinowego (ω -9) oraz niewielkie ilości nasyconych kwasów tłuszczowych (6% kwasu palmitynowego, 3% kwasu stearynowego) [123, 124]. Olej sojowy natomiast, zawiera 50% kwasu linolowego oraz około 8% kwasu α -linolenowego. Tak więc, olej sojowy jest bogatym źródłem kwasów z rodziny ω -6, zaś olej lniany dostarcza dużo kwasów z rodziny ω -3. Spośród olejów roślinnych, olej lniany prowadzi do najwyższego wzrostu niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny ω -3, po suplementacji nim w paszy [125].

Efekty włączenia do diety kurcząt oleju sojowego, lnianego i rzepakowego opisywano w wielu publikacjach [126-128]. Obecnie powszechnie stosowanymi źródłami tych kwasów w paszach jest między innymi soja i siemię lniane. Z lnu i siemienia lnianego produkuje się olej lniany. Właśnie to źródło tłuszczu okazało się najlepsze spośród olejów roślinnych, gdyż dodane do paszy w ilości około 10% na 20 dni przed ubojem skutkowało najwyższym wzrostem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny ω -3 oraz poprawie stosunku ω -6/ ω -3. Nieco mniejszy wzrost poziomu kwasów z rodziny linolenowej stwierdzono w przypadku suplementacji algami morskimi [125]. Sayadatii i in. [129] w swojej pracy podkreślają istotną rolę niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych w żywieniu zwierząt powołując się na wiele badań eksperymentalnych. W badaniach tych, wykazano zależność poprawy jakości mięsa drobiowego oraz wzrostu jego cech prozdrowotnych dzięki wprowadzeniu do diety kurcząt kwasu linolowego i linolenowego. Wprowadzenie tych kwasów do diety było wykonywane poprzez suplementację pożywienia olejami, takimi jak lniany, rybny, algami morskimi i olejem rzepakowym. W pracy Ferrini'ego i in. [130] porównano poziom niezbędnych, nienasyconych kwasów tłuszczowych, hormonów tarczycy oraz masy ciała dla trzech grup kurcząt. Grupa I żywiona była niskoenergetyczną dietą podstawową z dodatkiem 0,5% oleju słonecznikowego, grupa II otrzymywała do diety podstawowej dodatek 10% łoju wołowego, a grupa III 10% oleju lnianego. Najwyższą masę ciała uzyskały kurczęta grupy III przy jednoczesnym niższym dziennym spożyciu paszy w porównaniu do grupy I. Ponadto, wykazano, iż zawartość NNKT była najwyższa w grupie III, a najniższa u zwierząt na diecie z dodatkiem łoju wołowego.

Z literatury omawiającej problematykę wpływu żywienia na skład lipidowy tkanki mięśniowej brojlerów wynika, iż suplementacja diety drobiu kwasami NNKT wpływa dodatnio na poziom tych kwasów w tkankach.

1.2.9. Procesy tenderyzacji i utleniania związków lipidowych

W dzisiejszych czasach konsumenci oczekują, aby żywność spełniała wysokie standardy prozdrowotne, normy jakościowe i walory smakowe. Jakość mięsa kurcząt kształtowana jest przez cały okres chowu zwierząt. Na ostateczne wykształcenie cech jakościowych wpływa, zarówno właściwe postępowanie przed ubojowe, jak i poubojowa obróbka mięsa. Niezwykle istotnym etapem rzutującym na jakość produktu mięsnego jest konwersja tkanki mięśniowej w mięso [131]. Jest to proces zwany dojrzewaniem, tenderyzacją. Jego przebieg jest niezbędny, aby mięso uzyskało oczekiwane cechy i walory smakowe. Proces ten ma dwie fazy, tzw. fazę szybką, w której następuje szybkie osłabienie struktur miofibryli i fazę wolną charakteryzującą się rozluźnieniem struktur endomysium i perimysium. Proces ten, skutkuje poprawą kruchości mięsa i jego smaku.

Generalnie, finalne fizykochemiczne parametry mięsa, określające jego jakość, są efektem zmian strukturalnych i przemian biochemicznych zachodzących *post mortem* [132]. Część z tych procesów ma charakter biochemiczny i zachodzi pod wpływem endogennych enzymów, takich jak: kalpainy, katepsyny, proteinazy multikatalityczne i kaspazy [133, 134]. Mają miejsce również procesy o podłożu mikrobiologicznym (wywołane rozwojem mikroorganizmów), fizycznym (zmiana zawartości wody) lub chemicznym, w których najczęstszym procesem jest utlenianie związków lipidowych [135]. Wielu autorów akcentuje problem utleniania lipidów właśnie w mięsie drobiowym, a więc w materiale zawierającym znaczną ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych [136]. Proces utleniania lipidów mięsa ma swój początek tuż po uboju, a jego wydajność jest bezpośrednio związana z ilością podwójnych wiązań w kwasach tłuszczowych [137]. Reakcje utleniania struktur biologicznych, takich jak lipidy, są niezwykle złożone, wieloetapowe i różnorodne. Można tutaj wymienić autooksydację, polegającą na przyłączeniu tlenu do kwasu tłuszczowego, oraz utlenianie fotosensybilizowane, dla którego niezbędne jest światło oraz obecność sensybilizatora (np. barwników). Samoutlenianie, będące innym określeniem autooksydacji, bazuje na reakcji łańcuchowej produkującej wolne rodniki, które następnie uczestniczą w dalszych reakcjach [138, 139]. Jako początek wymienionych procesów przyjmuje się chwilę po uboju, gdy w wyniku pośmiertnych przemian biochemicznych dochodzi do zaburzenia równowagi między aktywnością endogennych przeciwutleniaczy i czynników prooksydacyjnych. Utlenianie lipidów ma zdecydowanie niekorzystny wpływ na barwę, teksturę i wartość odżywczą mięsa [140]. Istnieje wiele czynników warunkujących szybkość i kierunek utleniania lipidów, do najważniejszych należy skład chemiczny (ilość i rodzaj lipidów, zawartość wody), obecność naturalnych prooksydantów i antyoksydantów występujących w mięsie, procesy i operacje technologiczne, jak również warunki przechowywania mięsa [141]. Wiadomo, iż wydajność utleniania poszczególnych lipidów różni się od siebie. I tak, fosfolipidy charakteryzujące się wysoką zawartością polienowych

kwasów tłuszczowych, a więc są bardziej reaktywne i podatne na utlenianie niż lipidy składające się np. z acylogliceroli [142].

Ograniczenie procesów utleniania lipidów w mięsie przeprowadza się poprzez zastosowanie związków o charakterze przeciwutleniającym. Na przykład, dodatek fosforanów do mięsa opóźnia procesy utleniania przez kompleksowanie metali, szczególnie żelaza, które jest jednym z głównych prooksydantów w poddanym ogrzewaniu mięsie. Związki przeciwutleniające mogą być stosowane pojedynczo lub w postaci różnych mieszanek, jak również mogą obejmować wiele dodatków, od syntetycznych fenolowych przeciwutleniaczy do przeciwutleniaczy pochodzenia roślinnego [143].

Ze względu na duże zainteresowanie konsumentów surowym mięsem ważnym aspektem staje się czas i sposób przechowywania mięsa. Mięso utrzymywane w temperaturze 4°C charakteryzuje się korzystniejszymi właściwościami sensorycznymi i technologicznymi [144]. Temperatura przechowywania oraz odpowiedni dostęp do światła mają znaczący wpływ na szybkość i stopień utleniania lipidów.

1.2.10. Metody badań profili lipidowych

Ze względu na szerokie spektrum fizyko-chemicznych własności składników lipidowych i ich strukturalną różnorodność, dokonanie kompleksowej charakterystyki tych układów w badanej strukturze biologicznej nie jest możliwe przy użyciu tylko jednej techniki badawczej. Co więcej, dla wielu istniejących metod eksperymentalnych analiza natywnych struktur poszczególnych lipidów nadal stanowi duże wyzwanie [145, 146]. Z tych powodów oraz faktu niepodważalnego znaczenia lipidów i ich wielofunkcyjności w organizmach żywych, obecnie układy lipidowe są badane przy użyciu różnorodnych technik pomiarowych. Towarzyszą im określone procedury związane z właściwą preparatyką materiału biologicznego poddanego badaniu. Aktualna wiedza na temat roli, funkcji i patologii lipidów w żywych strukturach, a więc lipidomiki, jest więc wynikiem zastosowań wielu metod i technik pomiarowych. Są to między innymi metody grawimetryczne, kalorymetryczne, enzymatyczne, czy też chromatograficzne.

Zastosowane techniki to między innymi te wykorzystujące spektrometrię masową, MALDI-TOF (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry*), LC-MS (ang. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*), ESI-MS/MS (ang. *Electrospray Ionization - Mass Spectrometry*), czy też technika NMR [147-149]. Najczęściej zawartość kwasów tłuszczowych w materiałach biologicznych, żywności i wzbogacanych paszach dla zwierząt hodowlanych określa się przez klasyczną chromatografię gazową oraz chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią masową [150-153]. Wymienione powyżej techniki badawcze umożliwiają zarówno analizę jakościową jak i ilościową składników lipidowych, jednocześnie dostarczają cennych informacji dotyczących ich funkcjonowania w żywych organizmach. Świadczy

o tym szereg spektakularnych badań, kilka przykładów podano poniżej. I tak, za pomocą chromatografii gazowej wykazano neuroprotekcję kwasów PUFA z rodziny ω -3, takich jak DPA i EPA. Badania te wykazały istnienie zależności pomiędzy poziomem wymienionych kwasów, a zmianami behawioralnymi związanymi ze starzeniem się mózgu [154]. Tych samych kwasów dotyczyły badania z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i zastosowaniem spektrometrii masowej z jonizacją metodą rozpylania HPLC-ESI-MS/MS (ang. *High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*), które wykazały wpływ kwasów PUFA na neurodegenerację, padaczkę i udar mózgu. Dodatkowo, ujawniono powstawanie szlaków neuroprotekcyjnych, przeciwzapalnych lipidów, w tym pochodną DHA [155]. Technika HPLC-ESI-MS/MS wzbogaca o wyniki badań klinicznych i analizę ekspresji genów, umożliwiła uzyskanie informacji na temat związku między zaburzonym metabolizmem kwasu DHA i jego niskim poziomem w mózgu, a chorobą Alzheimera [156, 157]. Z kolei, techniki ESI-MS/MS i NMR zostały zastosowane do badań składu kwasów tłuszczowych mózgu szczurów będących genetycznym, zwierzęcym modelem depresji. Te eksperymenty wykazały zwiększoną zawartość kwasu AA zawierającego związki fosfatydylocholiny w wybranych obszarach mózgu [158]. Dużą część aktualnej wiedzy na temat umiejscowienia lipidów i pochodnych lipidów w błonach komórkowych uzyskano za pomocą obrazowania fluorescencyjnego [159-162]. Ten typ badań znajduje zastosowanie w diagnostyce medycznej oraz badaniu wchłaniania lipidów do układów biologicznych, jak również w badaniach podstawowych dotyczących ich transportu przez błony biologiczne [163].

Wymienione metody stosowane do analizy profilu lipidowego charakteryzują się różnym stopniem czasochłonności i kosztem badań oraz zróżnicowaną czułością. Większość z nich wymaga wyekstrahowania poszczególnych związków z badanego materiału biologicznego. Niektóre wymagają wzmożonych środków ostrożności gdyż są potencjalnie niebezpieczne dla ludzi i otoczenia ze względu na wykorzystanie rozpuszczalników organicznych [164]. W przypadku obrazowania fluorescencyjnego zachodzi konieczność znakowania fluorescencyjnego analizowanych molekuł. Ograniczoność metody wynika z faktu, że istnieje niewiele przeciwciał anty-lipidowych umożliwiających fluorescencyjny odczyt [165].

W oparciu o przeprowadzoną retrospekcję literaturową, można stwierdzić, iż istnieje potrzeba poszukiwań nowych rozwiązań i technik w celu analizy lipidów. Niewątpliwie, techniką przynoszącą obiecujące wyniki w tematyce badań związanych z lipidami, ich umiejscowieniem oraz względnymi zmianami zawartości w materiałach biologicznych, jest spektrometria masowa wtórnych jonów SIMS. Technika ta jest wolna od większości omawianych ograniczeń a równocześnie stwarza unikalne możliwości badawcze, które są niedostępne dla innych metod eksperymentalnych. Według wiedzy autorki, badania techniką SIMS wykonane dla materiału biologicznego prezentowanego w tej pracy wraz

z zanalizowanymi zmianami wywołanymi czynnikami środowiskowymi, nie mają jak dotąd odpowiedników w literaturze przedmiotu.

2. Fizyczne podstawy spektrometrii mas wtórnych jonów

Dotychczas przedstawiona teoretyczna część pracy odnosiła się do nauk biologicznych obejmujących wielorakie aspekty związane z charakterystyką układów lipidowych i tkanek, stanowiących główny materiał doświadczalny rozprawy. Głównym narzędziem badawczym rozprawy jest technika TOF-SIMS (ang. *Time of Flight- Secondary Ion Mass Spectrometry*). Metody badawcze oparte na spektrometrii masowej wtórnych jonów (SIMS), od kilku dekad dostarczają wartościowych informacji związanych z kompleksowym badaniem powierzchniowych warstw skondensowanej fazy. Uzyskiwane wyniki znajdują liczne zastosowania w wielu dziedzinach nauk przyrodniczych. Od lat 90-tych, SIMS jest również z powodzeniem wykorzystywany do zaawansowanych analiz materiałów biologicznych. Dotyczy to zarówno badań nad samymi molekularnymi strukturami biologicznymi, jak i badań całych tkanek. Obecnie, aparatura SIMS znajduje się na wyposażeniu wielu badawczych laboratoriów medycznych, farmaceutycznych oraz jest wykorzystywana w diagnostyce medycznej.

Procesy fizyczne leżące u podstaw działania techniki SIMS dotyczą, ogólnie mówiąc, oddziaływania ciężkich jonów, o energiach od kilku do kilkudziesięciu *keV*, z ciałem stałym. Jon ciężkiego atomu lub zjonizowany klaster atomowy bombarduje badaną próbkę (tarczę), na skutek czego z jej kilku powierzchniowych warstw emitowane są, między innymi atomy, molekuły będące macierzystymi składnikami próbki oraz molekularne fragmenty. Oprócz cząstek w neutralnym stanie, emitowane są również dodatnio i ujemnie naładowane jony. Zjawisko zwane jest rozpylaniem jonowym - erozją jonową. W literaturze przedmiotu jony bombardujące powierzchnie określane są mianem jonów pierwotnych, natomiast jony wyemitowane z powierzchni, jonami wtórnymi [166-168].

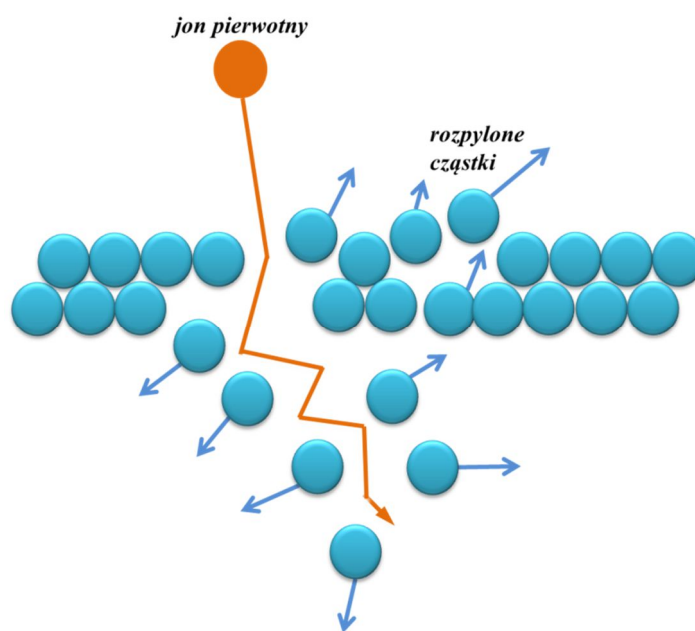
Działanie spektrometru SIMS bazuje na detekcji jonowej składowej strumienia rozpylanych cząstek. Uzyskane wyniki pozwalają na kompleksową charakterystykę powierzchniowego obszaru badanych próbek, między innymi jego składu i struktury. Efektywność działania aparatury SIMS zależy oczywiście od doskonałości rozwiązań technicznych w niej stosowanych, oraz od efektywności fizycznych procesów mających wpływ na wydajność emisji wtórnych jonów z badanego materiału. Procesy te, są opisane w dalszej części tego rozdziału, w nieco szerszym, jakościowym zarysie.

2.1. Oddziaływanie energetycznych jonów z ciałem stałym

Rozpylanie jonowe może być opisane jako zjawisko przebiegające w trzech etapach. Rozważając bilans energetyczny zjawiska, etap pierwszy to deponowanie energii jonu w bombardowanym materiale. W drugim etapie, zdeponowana energia rozprzestrzenia się na wewnętrzne oraz powierzchniowe obszary tarczy. Emisja cząstek z powierzchni tarczy to finalny etap rozpylania jonowego.

W etapie inicjującym zjawisko, jon pierwotny penetruje kolejne warstwy bombardowanego materiału i stopniowo wytraca swą kinetyczną energię na skutek elastycznych i elektronowych oddziaływa *jon-atomy tarczy*. Wielkością decydującą o efektywności deponowania energii jonu w materii, zasięgu jonu, jest strata jego energii (dE_0) na jednostkę drogi (dx). Całkowita strata (dE_0/dx) jest sumą strat zachodzących w elastycznych zderzeniach z atomami tarczy, $(dE_0/dx)_n$, oraz nieelastycznych strat w oddziaływaniach z elektronami tarczy, $(dE_0/dx)_e$. Te ostatnie prowadzą między innymi, do wzbudzeń i jonizacji atomów. Dla materiałów o atomowej koncentracji N , wielkość $1/N(dE_0/dx)$ jest przekrojem czynnym na określoną stratę energetyczną, $S(E_0)$. W przypadku jonów H^+ , He^+ o energiach kilkuset MeV, które są używane w terapii hadronowej, istnieje zależność $(dE_0/dx)_e \gg (dE_0/dx)_n$. Dla wiązek jonowych używanych w pomiarach SIMS człon $(dE_0/dx)_n$ jest dominujący.

Problematyka strat energetycznych jest omawiana w wielu pracach począwszy od artykułu Bohra z 1948 roku [169]. Kolejne, również pionierskie teorie, to prace Lindharda i Sigmunda [170, 171]. Podają one analityczne formuły opisujące zależność (dE_0/dx) od energii jonu, jego prędkości oraz liczby atomowej i masowej jonu (M_1, Z_1) oraz atomu tarczy (M_2, Z_2). Energia, którą atomy otrzymują w elastycznych zderzeniach, jest wystarczająca aby mogły one opuścić swe oryginalne położenia i zapoczątkować zderzenia między atomami tarczy. Schemat penetracji jonu w tarczy jest przedstawiony na **Rys. 3**.



Rys. 3. Schemat trajektorii jonu pierwotnego w ciele stałym oraz zapoczątkowanej kaskady zderzeń między atomami tarczy.

Dla uproszczenia, na rysunku założono, że wyłącznym składnikami tarczy są atomy (np. metale, półprzewodniki, stopy). Dla tarcz składających się z atomów różnego rodzaju, (dE_0/dx) jest sumą strat energetycznych dla poszczególnych składników z uwzględnieniem współczynników stechiometrycznych jako wagi

tych składników. W przypadku gdy podstawowym budulcem tarczy są związki molekularne, wzdłuż trajektorii jonu dochodzi do zrywania wiązań wewnątrz-molekularnych. W konsekwencji, oprócz atomów z kinetycznymi energiami, produkowane są również energetyczne fragmenty macierzystych molekuł. Zasięgi jonów o energiach kilkudziesięciu keV stosowanych w technice SIMS sięgają setek $\text{\AA}$.

2.2. Procesy zderzeniowe w ciele stałym

Etap następny jonowego rozpylania to sekwencja licznych zderzenia między atomami tarczy, mająca swój początek w oddziaływaniach pierwotny *jon-atom tarczy*. W przypadku materiałów o wyłącznie atomowym składzie (np. metale, półprzewodniki, stopy), zderzenia te noszą miano liniowej kaskady binarnych zderzeń. Rozprzestrzeniają się one stopniowo na coraz większe obszary tarczy i trwają do momentu gdy transfery energii w zderzeniach *atom-atom* nie przekraczają energii kohezji materiału tarczy. Termin kaskada binarnych zderzeń i analityczny opis dystrybucji energii w tarczy zostały zaproponowane w pracy Siegmunda [172]. Praca ta stanowi aktualny do dzisiaj, teoretyczny fundament zjawiska jonowego rozpylania atomowych materiałów o strukturze amorficznej. Opis dystrybucji energii w tarczy jest oparty na teorii transportu Boltzmann'a. Teoria podaje postać analityczną funkcji $F_D(E, x)$ określającej rozkład energii deponowanej przy udziale zderzeń *jon-atom* i *atom-atom*, wzdłuż normalnej do powierzchni tarczy. Wartość F_D dla bombardowanej powierzchni ($x=0$) jest często wyrażana poprzez relacje:

$$F_D(E_0, 0) = \alpha N S_n(E_0) \quad (1)$$

gdzie α jest bezwymiarowym parametrem zależnym od stosunku M_2/M_1 oraz kąta padania θ i stosunkowo mało wrażliwym na zmiany energii cząstki pierwotnej. Wartość funkcji F_D dla powierzchniowych warstw tarczy określa energię dostępną dla procesu emisji powierzchniowych cząstek. Efektywność emisji określa tzw. współczynnik rozpylania jonowego Y , definiowany jako liczba wybijanych z powierzchni cząstek przez jeden jon pierwotny. Opisuje go bardzo dobrze znana formuła [172, 173]:

$$Y = \Lambda \alpha S_n(E_0) \quad (2)$$

Parametr Λ jest stałą materiałową, odwrotnie proporcjonalną do energii wiązania powierzchniowych cząstek. Energia ta jest zwykle przybliżana energią sublimacji danego materiału. Współczynniki Y osiągają duże wartości w sytuacji gdy wiązania powierzchniowe cząstek są małe, a elastyczne straty energii pierwotnego jonu duże. Zwiększenie kąta padania jonu (względem normalnej do powierzchni tarczy) prowadzi do wzrostu współczynnika Y , największe wartości są osiągane dla kątów 45° - 65° .

2.3. Emisja powierzchniowych cząstek

Atomy tworzące powierzchniowe warstwy tarczy mogą być z niej wybite, gdy docierające do powierzchni kaskady zderzeń bombardujące jony przekażą im energię, wystarczającą do pokonania energii powierzchniowego wiązania U_0 , oraz pęd skierowany na zewnątrz tarczy. Dla materiałów takich jak metale, półprzewodniki, wartości Y wynoszą od kilku do kilkudziesięciu atomów w zależności od rodzaju i energii pierwotnego jonu. Strumień rozpylonych cząstek składa się w przeważającej mierze z atomów tarczy, niewielkiej ilości kilku atomowych klastrów, elektronów tarczy i fotonów emitowanych przez wzbudzone atomy. Atomy i klastry są emitowane głównie jako neutralne cząstki. Współczynniki emisji zjonizowanych cząstek, tzn. wtórnych jonów, wynoszą 10^{-2} - 10^{-4} całkowitego współczynnika rozpylenia Y . Rozkłady energetyczne rozpylonych neutralnych i zjonizowanych cząstek obejmują szeroki zakres energii, od ułamków eV do setek eV . Rozkłady osiągają maksima dla energii bliskich $U_0/2$ [174]. Około 95% wyemitowanych neutralnych cząstek i wtórnych jonów pochodzi z zewnętrznych dwóch warstw atomowych [175].

Istnieje kilka modeli próbujących analitycznie opisać mechanizm formowania wtórnego jonu i jego możliwą neutralizację tuż nad powierzchnią. Są to np. model tunelowania elektronowego (ang. *Electron Tunnelling Model*), model przerywania wiązań (ang. *Bond Breaking Model*), model rekombinacji (ang. *Recombination Model*). Dodatkowo, należy również brać pod uwagę zjawisko uzależnienia emisji wtórnego jonu od jego lokalnego otoczenia, zwane efektem matrycy [167, 168]. W przypadku tarczy jednoskładnikowej ilość wyemitowanych wtórnych jonów I jest proporcjonalna do współczynnika rozpylenia Y , koncentracji powierzchniowych atomów c oraz wielkości v , określającej prawdopodobieństwo produkcji wtórnego jonu i prawdopodobieństwo, iż może on opuścić powierzchniowy obszar tarczy bez neutralizacji elektronami tarczy.

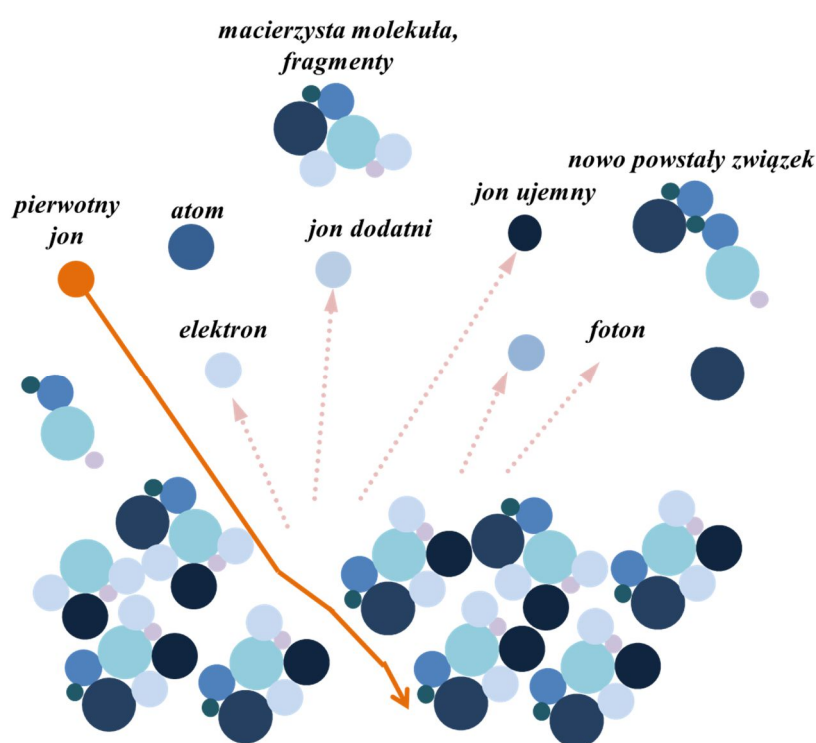
$$I \propto Y \cdot v \cdot c \quad (3)$$

Wielkość v jest bardzo silnie uzależniona od charakterystyki lokalnej struktury elektronowej obszaru powierzchni, z której emitowany jest wtórny jon. Do oszacowania wartości natężenia emisji wtórnych jonów w przypadku określonego składnika A próbki, stosuje się tzw. podstawowe równanie spektrometrii jonów wtórnych [167, 176]:

$$I_A = I_p \cdot \tau \cdot Y_A \cdot v \cdot c_A \quad (4)$$

gdzie: I_A -natężenie wtórnych jonów składnika A , I_p -natężenie jonów pierwotnych, τ -stopień transmisji spektrometru, Y_A -współczynnik rozpylenia składnika A , v -współczynnik określający prawdopodobieństwo jonizacji, c_A - stężenie/koncentracja pierwiastka A . Statystycznie, wydajność produkcji jonów dla materiału biologicznego jest stosunkowo niska, gdyż typowe wartości to od 10^{-2} do 10^{-6} wtórnych jonów, przypadających na pojedynczy pierwotny jon.

Wymienione modele jak również elementy teorii rozpylania jonowego przedstawione dotychczas odnoszą się jedynie do bardzo prostych układów *jon-tarcza*. W przypadku materiałów organicznych, teoretyczny opis rozpylania jonowego i procesów odpowiedzialnych za produkcję wtórnych jonów musi być nieporównywalnie bardziej skomplikowany. Na **Rys. 4** schematycznie przedstawiono emisję cząstek z tarczy o molekularnym składzie, bombardowanej wiązką energetycznych jonów.



Rys. 4. Emisja wtórnych cząstek z tarczy o składzie molekularnym pod wpływem bombardowania pierwotnym jonem.

W tym przypadku, oprócz cząstek obserwowanych dla prostych tarcz, emisji z powierzchni ulegają macierzyste molekuly bombardowanego materiału, ich różnorodne atomowe i molekularne fragmenty a nawet nowe związki chemiczne, które nie były obecne w tarczy przed rozpoczęciem jonowego bombardowania [166, 167]. Te ostatnie są efektem chemicznej aktywności rodników wyprodukowanych w procesach zderzeniowych, zainicjowanych przez bombardujący jon. W przypadku większości badanych materiałów największy procent z wyemitowanych cząstek stanowią te o neutralnym charakterze.

Emisja macierzystych molekuł, ich fragmentów oraz ich dodatnio i ujemnie naładowanych jonów jest efektem wielu złożonych procesów działających na każdym etapie przebiegu jonowego rozpylania. Jakkolwiek podstawowe równanie spektrometrii jonów wtórnych zachowuje swą aktualność dla materiałów o molekularnym składzie, to brak jest powszechnie akceptowanych teoretycznych modeli procesów, których wydajności występują w równaniu. Rozważając na przykład współczynnik rozpylania, natychmiast dochodzi się do konkluzji, że model kaskad binarnych i elastycznych zderzeń, na którym opiera się klasyczna

teoria rozpylania, nie może być stosowana w materiale o molekularnej strukturze. Zderzenia jonu z molekułami skutkują dekompozycją molekuł, powstają ich fragmenty o różnym składzie. Część energii przekazywanej w zderzeniach powoduje wzbudzenie drgań oscylacyjnych macierzystych molekuł i ich fragmentów. Podobne procesy zachodzą na etapie dystrybucji zdeponowanej energii wewnątrz tarczy. Dystrybucja ta odbywa poprzez oddziaływania *molekuła-molekuła*, molekularny *fragment-molekuła*, nie można jednak założyć, że oddziaływania te są elastyczne i binarne. Dodatkowo, nie są znane potencjały tych oddziaływań w zakresie energii o kilka rzędów wielkości większych od energii termicznych.

Zjawisko rozpylania jest jeszcze bardziej skomplikowane gdy materiał organiczny bombardowany jest wieloatomowym jonowym klastrem. W tym przypadku, większość informacji o procesie rozpylania i emisji wtórnych jonów pochodzi z symulacji komputerowych przeprowadzonych techniką dynamiki molekularnej (MD). Na uwagę w tej tematyce zasługują prace zaprezentowane przez takich autorów jak Postawa, Garrison i Winograd [177-179]. Symulacje te, przeprowadzono dla układów molekularnych dużo prostszych od tych badanych w niniejszej rozprawie. Symulacje MD nie uwzględniają procesów i oddziaływań leżących poza zakresem klasycznej mechaniki, a więc żadne efekty kwantowe jakiegokolwiek rodzaju nie są uwzględniane [180]. Takie podejście jest założeniem nie do końca odzwierciedlającym rzeczywiste procesy uczestniczące w molekularnym rozpylaniu, nie mniej jednak dostępne symulacje stanowią cenne, jakościowe źródło informacji o przebiegu zjawiska.

2.4. Spektrometria masowa TOF-SIMS

Standardowy układ spektrometru przeznaczonego do badań widm masowych dodatnio lub ujemnie zjonizowanych cząstek, emitowanych z powierzchni ciał stałych pod wpływem bombardowania jonowego, składa się z trzech zasadniczych segmentów. Segment pierwszy, to źródło jonowe wraz z elektrostatycznym układem formowania i prowadzenia wiązki jonów pierwotnych bombardujących powierzchnie analizowanej próbki. W segmencie drugim, dokonywana jest analiza masowa zjonizowanych cząstek - wtórnych jonów emitowanych z próbki. W zależności od metody, w oparciu o którą dokonywana jest separacja masowa, wiązka jonów pierwotnych jest ciągła lub pulsacyjna. Po przejściu przez analizator mas jony są zliczane przez układ detekcyjny spektrometru. Obecny rozdział jest poświęcony w głównej mierze technice TOF-SIMS, za pomocą której uzyskano wyniki prezentowane w tej pracy. Oprócz charakterystyki poszczególnych segmentów spektrometru, rozdział opisuje możliwe mody pracy spektrometru, stosowaną preparatykę próbek oraz metody analizy danych.

2.4.1. Działo jonowe

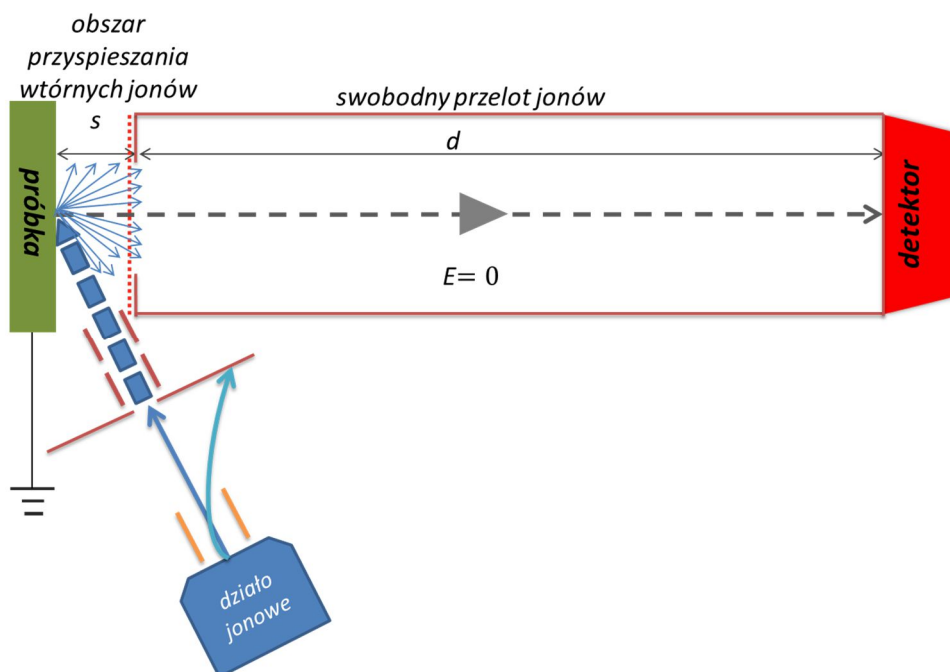
Wartość naukowa widm masowych wtórnych jonów jest uwarunkowana wysoką klasą i sprawnością wszystkich segmentów wchodzących w skład spektrometru. Wymagania dotyczące działu jonowego produkującego wiązkę jonów bombardujących powierzchnie próbki to mono-energetyczność wiązki, jej stabilność, możliwość zmian jej natężenia w szerokim zakresie (pA - μA) oraz możliwość ogniskowania wiązki do rozmiarów zapewniających wysoką zdolność rozdzielczą przy obrazowaniu 2D powierzchni próbki i obrazowaniu 3D jej powierzchniowych warstw.

W początkowej fazie rozwoju SIMS, jako gazu roboczego działu jonowych używano głównie ciężkich gazów szlachetnych. Od 2000 r. do pomiarów wprowadzono wiązki zjonizowanych atomów metali, tj. Ga^+ , Cs^+ , które umożliwiały osiągnięcie wysokiego stopnia zogniskowania wiązki na badanej powierzchni. Ogłoszona w 1998 r. praca przez La Beyec'a [181] wykazała, że bombardowanie powierzchni skondensowanej fazy zjonizowanymi, atomowymi klastrami metalu, zwiększa proces rozpylania powierzchni i emisję wtórnych jonów. Do użytku wprowadzono więc, działu jonowe wytwarzające wiązki jonów molekularnych gazów, np. SF_5^+ , metalicznych klastrów jak Au_n^+ , Bi_n^+ , fulerenów C_{60}^+ , czy też klastrów gazów szlachetnych jak np. Ar_{2000}^+ [167, 182]. Ta intensyfikacja emisyjnych procesów jest związana ze wzrostem energii deponowanej przez wieloatomowe klastry o dużych masach w powierzchniowym obszarze bombardowanej próbki. W opisie teoretycznym procesu rozpylania jonowego oznacza to wzrost wartości funkcji F_D wraz ze wzrostem masy pocisku [183, 184].

Typowa, stosowana współcześnie aparatura TOF-SIMS wykorzystywana do analizy powierzchni, wyposażona jest w ciekło-metaliczne działu LMIG (ang. *Liquid Metal Ion Gun*) generujące intensywną wiązkę jonową, która z użyciem układów ogniskujących może być skupiona na powierzchniach rzędu stu nanometrów [185, 186]. Zapewnia to wysoką zdolność rozdzielczą obrazowania 2D powierzchni badanej próbki. Wysokiej klasy aparatura TOF-SIMS jest również wyposażona w działu klastrowe, np. fulerenowe. Dostarcza ono wiązek jonów C_{60}^+ o energiach kilkudziesięciu keV , które są szczególnie przydatne do obrazowania 3D próbki. [187, 188]. W celu neutralizacji ładunku powstałego na powierzchni badanej próbki, w trakcie jej jonowego bombardowania, w spektrometrach TOF-SIMS, stosuje się niskoenergetyczne działu elektronowe o impulsowej wiązce. Działu elektronowe napromieniowuje próbkę wiązką elektronów o niskich energiach nieprzekraczających 20 eV [167, 182]. Energie te są niższe od energii jonizacji i energii stanów anty-wiążących związków molekularnych wchodzących w skład badanego materiału. Stąd, elektronowa neutralizacja powierzchni nie prowadzi do jej uszkodzeń.

2.4.2. Analizator mas

W spektrometrii masowej wtórnych jonów zastosowanie znalazło wiele typów analizatorów mas, między innymi kwadropolowy, magnetyczny czy też magneto-elektrostatyczny [189, 190]. Kolejnym rodzajem jest analizator czasu przelotu TOF, który w przeciągu ostatniego dwudziestolecia zdobył dużą popularność i bardzo szerokie zastosowanie, włączając w to badania o charakterze biomedycznym [189, 191]. W tego typu urządzeniu, separacja jonu o danym stosunku m/z dokonuje się poprzez pomiar czasu przelotu jonu przez obszar o zdefiniowanej długości. Pierwszy prototyp aparatury powstał w połowie lat 50-tych ubiegłego wieku, a został opisany kilka lat wcześniej przez W.E. Stephensa [168, 192]. Schemat układu, w wersji tzw. liniowego spektrometru TOF, znajduje się na **Rys. 5**. Praca spektrometru przebiega w warunkach ultra-wysokiej próżni [175].



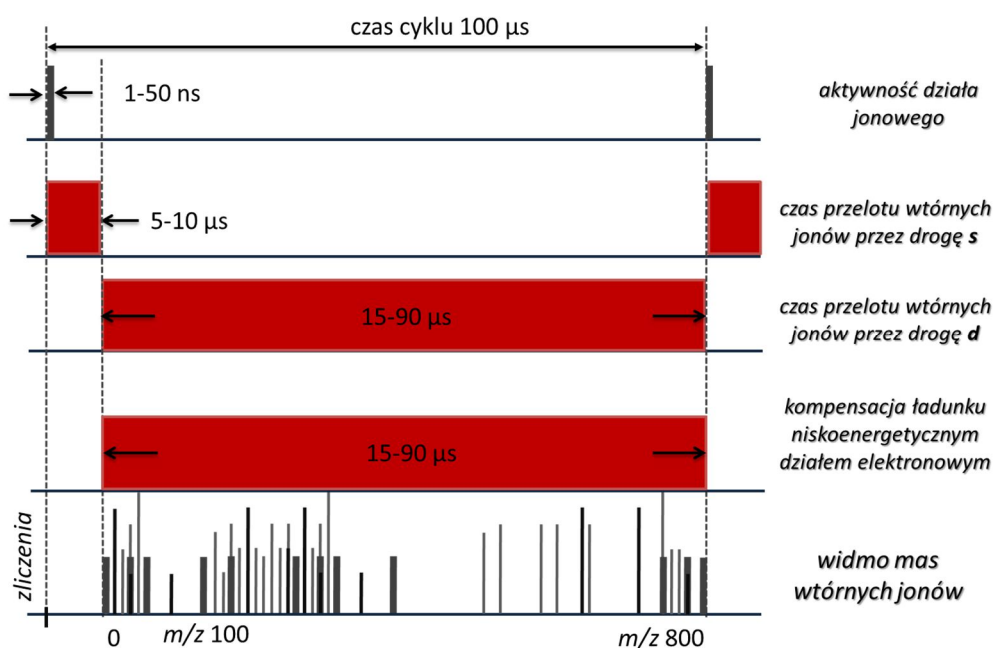
Rys. 5. Schemat liniowego analizatora TOF.

Badana próbka jest bombardowana zogniskowaną, monoenergetyczną, pulsującą wiązką jonową o energii kilkadziesiąt keV . W pierwszej fazie cyklu pomiarowego, wtórne jony emitowane z powierzchni są przyspieszane w polu elektrostatycznym, na drodze s , do określonej energii kinetycznej [167]:

$$\frac{mv^2}{2} = zeV \Rightarrow v = \left(\frac{2zeV}{m} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

gdzie: m – masa emitowanego wtórnego jonu, v – jego prędkość, z – stopień jego jonizacji, e – ładunek elektronu, V – napięcie przyspieszające. Zmienna polaryzacja obszaru s stwarza możliwość przyspieszania zarówno dodatnio jak i ujemnie naładowanych wtórnych jonów. W obu tych przypadkach, mówimy odpowiednio o dodatnim i ujemnym modzie pracy spektrometru. Po przyspieszeniu, jony

w czasie t , pokonują drogę o długości d w komorze analizatora z nadaną im prędkością v . Wnętrze komory analizatora stanowi elektrostatycznie izolowany obszar, często nazywany obszarem dryfu, gdzie na jony nie działają żadne siły. Stąd, czas przelotu wtórnego jonu na drodze d jest określony prostą relacją $t = s/v$. Początek pomiaru czasu t jest wyzwalany impulsem wiązki z działu jonowego. Koniec pomiaru jest wyznaczany pojawieniem się sygnału z układu detekcyjnego umieszczonego na końcu komory analizatora. Ten z kolei sygnał jest wyzwalany uderzeniem wtórnych jonów o ściany detektora. Na **Rys. 6** przedstawiono elementarną sekwencję czasową pracy spektrometru TOF.



Rys. 6. Schemat cyklu pracy spektrometru masowego TOF.

Jak widać, jeden cykl zawiera impuls wiązki jonowej bombardującej próbkę, interwał czasu, w którym wybite z powierzchni cząstki są przyspieszane, okres czasu ich przelotu przez obszar dryfu oraz czas aktywności źródła elektronów, w którym dokonuje się neutralizacja ładunku zgromadzonego na powierzchni próbki. Czasy podane na **Rys.6** charakteryzują spektrometr TOF-SIMS, za pomocą którego wykonano pomiary prezentowane w tej pracy. Ostatecznie, czas przelotu jonów opisany jest wzorem:

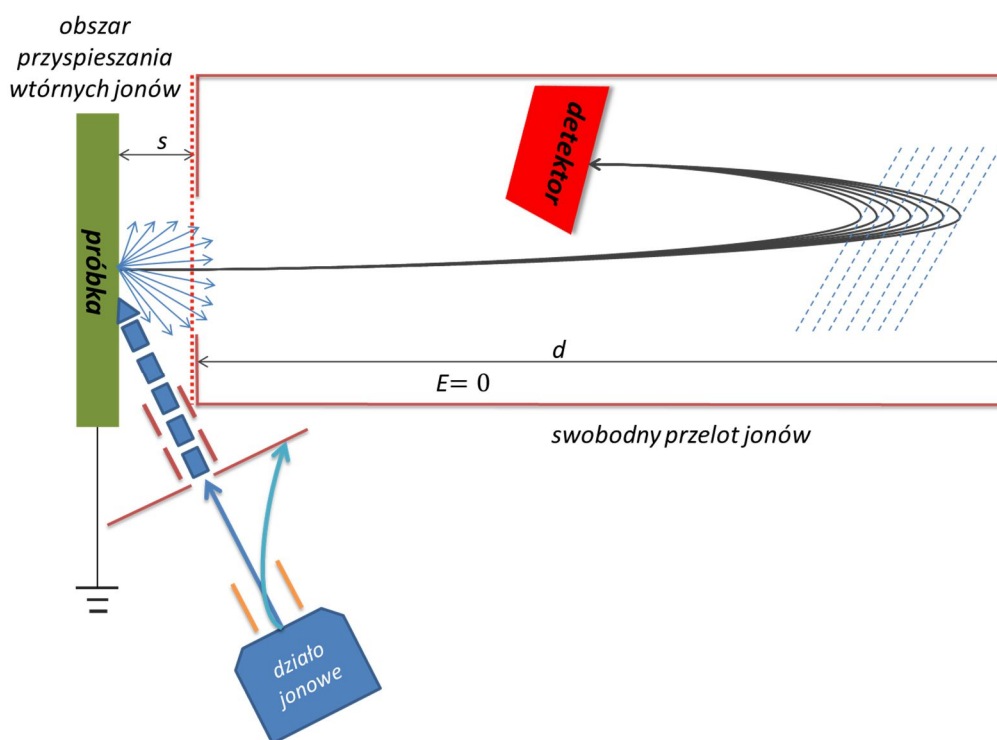
$$t = \left(\frac{m}{2zeV} \right)^{\frac{1}{2}} d \quad (6)$$

Wynika z niego, że otrzymany czas przelotu, mieszczący się przeważnie w zakresie od 10 do 200 μs , pozwala na jednoznaczne wyznaczenie wielkości m/z charakteryzujących jony emitowany z badanej powierzchni.

Zdolność rozdzielcza pomiaru masy atomowej badanych jonów, definiowana jako $m/\Delta m$, gdzie m jest masą atomową danego jonu, a Δm odległością między dwoma najbliższymi, jeszcze rozróżnialnymi na widmie masami, zależy od

dokładności wyznaczenia czasu przelotu t , dla jonu o danej masie m . Głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za rozmycie czasu t dla jonów o danym m/z , jest szerokość czasowa impulsu wiązki jonowej inicjującej proces rozpylania badanej powierzchni, rozkład kątowy emitowanych wtórnych jonów, a przede wszystkim ich początkowy rozkład energetyczny [167, 168]. Skala energetyczna tego rozkładu pokrywa kilka rzędów wielkości, od energii termicznych do setek eV dla jonów bombardujących o energiach kilkudziesięciu keV. Powoduje to, że jony o tej samej masie atomowej i krotności jonizacji, różnią się energiami kinetycznymi podczas przelotu przez komorę analizatora. W konsekwencji, zamiast jednej wartości czasu przelotu zarejestrowany zostanie jego rozkład dla jonów o tym samym m/z . Szerokość tego rozkładu determinuje szerokość pików na widmie - *masa atomowa jonu m vs. czas przelotu t* i konsekwentnie na widmie masowym - *liczba zliczeń vs. masa m* .

W obecnie wykorzystywanych spektrometrach TOF-SIMS, w celu zwiększenia masowej zdolności rozdzielczej, analizator mas jest dodatkowo wyposażony w zwierciadło elektrostatyczne, tzw. reflektrom. Jego głównym celem jest dokonanie monoenergetyzacji badanych jonów zanim dotrą do detektora. Schemat spektrometru, w wersji z reflektromem, umieszczono na **Rys. 7** [168].



Rys. 7. Schemat spektrometru TOF-SIMS z reflektromem.

W dużym skrócie, reflektrom stanowi niejako przedłużenie komory analizatora a detektor, w tym przypadku, jest umieszczony w jego dolnej części, jak pokazano na **Rys. 7**. Główna część reflektromu to układ wielu równoległych siatek znajdujących się na drodze cząstek opuszczających obszar dryfu. Na końcową siatkę przyłożone jest napięcie elektryczne o wartości większej od wartości napięcia przyspieszającego (impulsu przyspieszającego) przed obszarem dryfu. Na

siatki położone niżej są przyłożone odpowiednio niższe potencjały elektryczne, tak aby powstał gradient potencjału elektrycznego. Siły elektrostatycznego oddziaływania powodują zmianę kierunku ruchu jonów penetrujących reflektora. Jony o takich samych masach, lecz różniące się prędkościami, a więc energiami kinetycznymi, będą wnikać na różną głębokość w objętość reflektora [167, 192]. Obecność siatek elektrycznych tworzących obszar reflektora powoduje zróżnicowanie drogi, którą przebywa jon w zależności od jego energii, tzn. jon o większej energii pokona dłuższą drogę niż jon o takiej samej masie, ale o mniejszej energii. Dzięki temu, zminimalizowana zostanie istniejąca wcześniej różnica w czasach przelotu jonów o takich samych wartościach m/z . Reasumując, użycie reflektora pozwala aby cząsteczki o jednakowych wartościach stosunku m/z , ale pierwotnie różniące się energią kinetyczną, po odbiciu od reflektora, docierały do detektora w prawie identycznym czasie [168, 182, 189].

Spektrometry mas typu TOF posiadają szereg zalet. Charakteryzują się bardzo wysokim stopniem transmisji, szerokim zakresem mas analizowanych cząstek, przekraczającym 10^4 amu, wysoką zdolnością rozdzielczą rzędu 10^4 oraz wysoką czułością na poziomie ppm . Istotną zaletą spektrometru jest równoczesna detekcja wszystkich wtórnych jonów rozpylanych z badanej próbki jonowym bombardowaniem. Dotyczy to powierzchniowego obrazowania próbki jak również badania jej profili głębokościowych [167, 190-192].

2.4.3. Detekcja wtórnych jonów

Rejestracja wtórnych jonów w spektrometrze TOF-SIMS odbywa się w reżimie zliczania pojedynczych jonów w systemie detekcyjnym złożonym z płytki mikrokanałkowej MCP (ang. *Microchannel Plate*). Powierzchnia tego detektora składa się z wielu miniaturowych (średnica 10 – 100 μm), kanałowych powielaczy elektronów CEMs (ang. *Channel Electron Multipliers*), w których produkowane są wtórne elektrony na skutek zderzeń pojedynczych analizowanych jonów z wewnętrzną powierzchnią ścian powielacza. Powstałe w ten sposób elektrony, wyzwalają elektrony następnych generacji poprzez zderzenia ze ścianami powielacza. Kaskadowa produkcja elektronów umożliwia otrzymanie sygnału elektrycznego o odpowiedniej dużej amplitudzie (stopień powielenia w obszarze 10^4 – 10^8 krotnym) [167]. Rejestracja takiego sygnału oznacza detekcję jednego jonu.

Pojedynczy impuls wiązki jonowej powoduje wybite z powierzchni cząstek o różnych masach, docierają one do detektora w różnych czasach. Tak więc, jeden impuls wiązki powoduje, że na wyjściu detektora jest rejestrowany szereg sygnałów pochodzących od cząstek o różnych masach. Czasowa sekwencja pojawiania się tych sygnałów jest zależna od mas rejestrowanych jonów. Kolejno następujące impulsy wiązki powodują wzrost liczby zliczeń dla konkretnego czasu detekcji, charakterystycznego dla określonej masy cząstki. Powstałe w ten sposób widmo czasu przelotu wtórnych cząstek jest automatycznie przeliczane na widmo masowe.

Skanowanie techniką TOF-SIMS wybranego obszaru powierzchni próbki umożliwia otrzymanie nie tylko widma masowego charakterystycznego dla całego badanego obszaru, lecz wnosi również informację o powierzchniowym rozkładzie atomów, molekuł w obrębie tego obszaru. Jest to możliwe dzięki procedurze, według której dokonywany jest całościowy pomiar widma. Impulsy wiązki jonowej wielokrotnie bombardują przypadkowo wybrane, liczne miejsca w obrębie zadanego obszaru i równocześnie, dla każdego bombardowanego miejsca dokonywany jest pomiar widma wtórnych jonów.

Obrazując pogładowo pomiar widma z zadanego obszaru, można powiedzieć, że składają się na niego widma pochodzące z wielu mini-obszarów bombardowanych przez wiązkę pierwotnych jonów, a intensywność poszczególnych pików całościowego widma jest wyznaczona przez sumę liczby zliczeń jonów o odpowiednich masach, pochodzących z bombardowanych mini-obszarów. Wybierając więc, z całościowego widma obszaru, pik odpowiadający macierzystemu jonowi interesującego nas związku molekularnego *X* lub jego fragmentowi, można skonstruować obraz 2D lokalizacji molekuly *X* na całym badanym obszarze, analizując liczbę zliczeń jonów *X*, emitowanych z poszczególnych mini-obszarów. Ten tok postępowania może być stosowany dla dowolnych związków molekularnych, których charakterystyczne jony są zawarte w całościowym widmie obszaru, o ile intensywność odpowiadających im pików jest odpowiednia duża.

2.5. Mody pracy TOF-SIMS

We współczesnej spektrometrii masowej wtórnych jonów rozróżnia się dwa podstawowe reżimy pracy spektrometru masowego: statyczny (ang. *static SIMS*), i dynamiczny (ang. *dynamic SIMS*, *depth profiling*). Parametrami różnicującymi oba tryby pracy jest natężenie wiązki jonów bombardujących próbkę (liczba jonów na jednostkę powierzchni i czasu) oraz czas, w którym próbka jest bombardowana [167].

Wybicie z badanej powierzchni przez pojedynczy jon wiązki, atomu czy molekuly oznacza, że na powierzchni został utworzony defekt. Oznacza to powstanie lokalnego zaburzenia struktury elektronowej i własności chemicznych obszaru wokół utworzonego defektu. Rozmiar tego obszaru zależy od rodzaju próbki. Prawdopodobieństwa jonizacji wybijanej cząstki i jej neutralizacji przy powierzchni zależą od fizyko-chemicznych cech obszaru, z którego cząstka jest emitowana. W konsekwencji, widma masowe pochodzące z uszkodzonych i nieuszkodzonych obszarów tej samej próbki mogą się znacznie różnić, zarówno pod względem zestawu masowych pików widma jak również ich intensywności. Widma charakterystyczne dla nieuszkodzonej powierzchni uzyskują się w statycznym reżimie pracy spektrometru. Narzuca on silne ograniczenie na natężenie użytej wiązki jonowej oraz na czas bombardowania powierzchni, aby maksymalnie zminimalizować prawdopodobieństwo emisji wtórnych jonów z już zdefektowanych obszarów powierzchni. Warunek ten jest osiągany gdy doza

jonów wiązki pierwotnej, konieczna do pomiaru widma, jest o kilka rzędów wielkości niższa od powierzchniowej atomowej koncentracji badanej powierzchni. W statycznym reżimie pracy typowe parametry pracy spektrometru to natężenie wiązki na poziomie pA – nA , a szerokość impulsu wiązki 1-100 ns. Powierzchniowa czułość pomiarów, zakres analizowanych mas, masowa zdolność rozdzielcza zachowują swoje wysokie wartości w statycznym reżimie pracy spektrometru [167, 176, 189].

W dynamicznym trybie SIMS natężenie pierwotnej wiązki jest znacznie większe. Ten tryb pracy jest stosowany głównie do rozpylania (usuwania) powierzchniowych warstw badanego materiału, co w efekcie umożliwia analizę składu chemicznego wnętrza próbki, z równoczesnym pomiarem koncentracji poszczególnych składników tarczy [176, 189].

Oba tryby pracy, dynamiczny i statyczny, są z powodzeniem wykorzystywane w charakterystyce struktur biologicznych, generując odmienny zasób informacji w stosunku do stosowanych do tej pory metod. W przypadku analizy próbek biologicznych technika ta umożliwia otrzymanie widm w zakresie od 1 do 1000 m/z .

2.6. Preparatyka próbek

Charakterystyka próbek biologicznych metodą TOF-SIMS wymaga zdecydowanie bardziej zaawansowanej metodyki przygotowania materiału niż ma to miejsce w przypadku próbek nieorganicznych. Podczas procedury preparacyjnej próbek biologicznych, takich jak tkanki, konieczne jest uwzględnienie wielu czynników rzutujących na wiarygodność i jakość otrzymywanych wyników. Przede wszystkim istotne jest zachowanie możliwie natywnej fizjologii i morfologii badanych struktur, a więc ważnym wymogiem jest zabezpieczenie chemicznej i strukturalnej integralności materii biologicznej. Konieczna jest ochrona powierzchni próbki przed zanieczyszczeniami. Spektrometria masowa wtórnych jonów jest techniką wysoce czułą powierzchniowo, z tego względu próbki powinny być przechowywane i przygotowywane z dużą ostrożnością w celu minimalizowania prawdopodobnych, powierzchniowych kontaminacji. Wszystkie próbki do analizy porównawczej powinny być przygotowywane wedle tego samego protokołu oraz możliwie w tym samym czasie [193]. Pożądane jest, aby procedura preparatyki była w miarę możliwości prosta, powtarzalna oraz niedroga, tak aby z łatwością mogła być wprowadzona do rutynowej analizy [194, 195].

Główny problem w badaniach struktur biologicznych za pomocą techniki SIMS wynika z faktu, iż pomiary widm masowych muszą być prowadzone w warunkach ultra-wysokiej próżni. Ekspozycja biologicznej próbki na warunki próżniowe powoduje przemieszczanie się lotnych związków z ich macierzystych lokalizacji, w tym usunięcie z jej objętości wody w procesie szybkiego parowania. Wzrost ciśnienia parcjalego w spektrometrze utrudnia pomiary i analizę otrzymywanych widm, a w skrajnych przypadkach wręcz uniemożliwia dokonanie

tych pomiarów. W przypadku wysoce uwodnionych próbek zachodzi konieczność usunięcia wody z materiału biologicznego przed rozpoczęciem właściwych pomiarów.

Większość komórek i tkanek biologicznych składa się w 70% z wody, która pełni ważne funkcje dla właściwości i struktury większości biologicznych systemów. Jej gwałtowne usuwanie może powodować wiele zniszczeń w strukturze biologicznej oraz przyczynić się do migracji cząsteczek/atomów z ich pierwotnych miejsc powodując duże zmiany w natywnym stanie chemicznym. Jest to przyczyna, dla której koniecznym jest aby w procesie preparatyki próbki biologicznej następowało powolne usuwanie cząsteczek wody z badanych systemów biologicznych [196].

Istnieje wiele opisanych i sprawdzonych sposobów usuwania cząsteczek wody i przygotowania próbki w celu analizy techniką TOF-SIMS. Pośród tych procedur wyróżniają się trzy najczęściej opisywane i stosowane. W dwóch, z poniżej wymienionych metod, stosowane jest ultra szybkie mrożenie ($> 5000 \text{ K s}^{-1}$) w celu uniknięcia mechanicznych zniszczeń struktury powstających na skutek wzrostu kryształów lodu w procesie wolnego ochładzania biologicznej próbki [197].

Pierwszą metodą jest liofilizacja (ang. *freeze – drying*), podczas której struktura biologiczna jest gwałtownie mrożona np. w ciekłym propanie, a następnie woda jest usuwana w kontrolowany sposób poprzez sublimację w niskiej temperaturze. W kolejnym etapie, przechowuje się próbkę w ciekłym azocie, po czym przed właściwymi pomiarami ogrzewa się ją powoli w warunkach próżniowych do temperatury pokojowej w celu ostatecznej dehydratacji [198].

Drugą metodą jest chemiczne utrwalanie, najczęściej w formalinie lub aldehydzie glutarowym, które to związki wzajemnie wiążą białka komórkowe w celu utrwalenia chemicznej i fizycznej struktury badanego materiału biologicznego.

Ostatnia to metoda wymagająca specjalistycznego oprzyrządowania, jest nią „łamanie” uwodnionego, zamrożonego materiału biologicznego (ang. *freeze fracture*). Procedura ta polega na gwałtownym mrożeniu w ciekłym propanie lub izopropanie próbki umieszczonej między dwoma substratami (np. płytkami krzemu), następnie przechowywaniu w natywnym, uwodnionym stanie i ostatecznie za pomocą specjalnego urządzenia próbka jest rozłamywana tak, aby wyeksponować wnętrze materiału. Wydaje się, że jest to jedna z najlepszych aktualnie stosowanych metod do badań materiału biologicznego w warunkach próżniowych, oraz która niweluje gromadzenie się wody na powierzchni próbki [199]. Metoda ta, z powodzeniem jest stosowana w mikroskopii elektronowej, do badań techniką SIMS została zaadoptowana w latach 80-tych [200].

Oczywiście, o ile jest to możliwe, zdecydowanie najbardziej optymalnym podejściem jest przygotowanie próbki w jej niezmienionym, uwodnionym stanie, gdyż po takim przygotowaniu struktura jest najbardziej zbliżona do swej natywnej natury [198, 201]. Przegląd literaturowy wskazuje na przykład, że obecność wody

w materiale biologicznym, jak również zachowanie pierwotnej struktury dwuwarstwy lipidowej zapewnia optymalne warunki do jonizacji, co więcej ten sposób preparatyki umożliwia otrzymanie bardzo dobrych wyników w analizie ilościowej oraz w obserwacji przegrupowania lipidów w błonach komórek *Tetrahymeny* [198, 202, 203]. Jednak, również w tej metodzie, obserwowane są artefakty, które należy brać pod uwagę podczas analizy. Są one spowodowane między innymi, specyficzną topografią otrzymanej powierzchni oraz jej efektywnym ładowaniem się w trakcie bombardowania jonowego, gdy próbka ma zbyt dużą grubość. Neutralizację powierzchniowego ładunku jest trudno przeprowadzić nawet po zastosowaniu napyłania elektronami, co powoduje iż analiza ilościowa otrzymanych wyników jest utrudniona. Co więcej, jak już wspomniano metoda ta wymaga specjalistycznego sprzętu sprzężonego z aparaturą TOF-SIMS.

Innym istotnym czynnikiem, który należy rozpatrzyć w trakcie przygotowania materiału biologicznego do pomiarów SIMS jest czas upływający między momentem uzyskania próbki, poprzez przykładowo wycięcie tkanki, a rozpoczęciem zasadniczego pomiaru. Warto w tym miejscu nawiązać do rezultatów przedstawionych przez Sjöwalla i in. [204] oraz Debois i in. [204, 205], wskazujących na migrację lipidów do powierzchni próbki, w czasie pomiędzy cięciem skrawków na kriotomie w temperaturze ok. -20°C , a ich analizą przeprowadzoną w próżni, w temperaturze pokojowej. Dotychczas opisane badania nie wykazują równoczesnej depozycji lateralnej składników biologicznych próbek. W konsekwencji większość lipidów jest skupiona w powierzchniowych warstwach, tj. w obrębie 200-300 nm.

Relatywnie częstą procedurą stosowaną w badaniach materiału biologicznego metodą SIMS jest deponowanie nanowarstwy (jednej lub dwóch) srebra lub złota na badanych powierzchniach [206]. Ma to na celu zwiększenie przekroju czynnego na jonizację cząstek emitowanych z powierzchni, co prowadzi do wzrostu sygnału wtórnych jonów. Dodatkowo, metaliczna nanowarstwa skutecznie zapobiega gromadzeniu się ładunku na bombardowanej powierzchni. Te efekty były obserwowane przez Nygren'a i in. [207] w badaniach krwinek oraz tkanek z materiału pobranego z nerek.

W przypadku analizy tkanek pod względem obecności oraz zawartości lipidów można zastosować każdą z powyżej opisanych metod, oczywiście w miarę posiadanych zasobów laboratoryjnych oraz aparaturowych.

Konkludując, można stwierdzić, iż pomiary próbek biologicznych spektrometrią masową TOF-SIMS stanowią, w dalszym ciągu, duże wyzwanie dla eksperymentatorów. Jednak zważywszy na istotę informacji jakie dostarcza ta technika, niezwykle cenne jest udoskonalanie już istniejących procedur oraz praca nad nowymi metodami przygotowania materiału biologicznego.

2.7. Analiza danych eksperymentalnych

Nie istnieje jeden, idealny protokół zawierający parametry aparaturowe oraz opis preparatyki próbek, który mógłby być uniwersalnie stosowany w badaniach różnych struktur biologicznych metodą SIMS. Na przykład, zdecydowanie odmiennego podejścia eksperymentalnego wymaga obrazowanie komórkowe a innego analiza lipidów w próbkach tkankowych. Niewątpliwie wspólną cechą badań SIMS układów biologicznych jest wysoka złożoność uzyskiwanych widm masowych, wymagająca dużego nakładu pracy celem interpretacji bardzo licznych pików masowych w widmach. Równocześnie, uzyskane pomiary pozwalają na kompleksową analizę badanej próbki, obejmującą identyfikację struktur molekularnych, określenie ich koncentracji oraz zobrazowanie ich powierzchniowej lokalizacji, niezależnie od rodzaju materiału biologicznego poddanego badaniu.

W kontekście analiz powierzchniowych układów biologicznych technikami SIMS jako efekt końcowy otrzymuje się widmo masowe, a więc wykres zależności liczby zliczeń od masy atomowej rejestrowanej cząstki. Na otrzymanym widmie można zlokalizować piki molekularne, których masy są identyczne jak masy macierzystych cząsteczek wchodzących w skład próbki, piki pseudomolekularne, których masy są powiększone o określony addukt (np. $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$) oraz fragmenty wyemitowanych molekuł. Przeważnie w trakcie fragmentacji emitowanych molekuł odrywają się grupy funkcyjne (np. OH^-) lub jak ma to miejsce w przypadku polimerów powtarzające się fragmenty, monomery. Stąd, pierwszym i koniecznym etapem analizy danych jest identyfikacja interesujących nas związków, dla których znane są charakterystyczne masy atomowe pików oraz ich fragmentów. Ze względu na fakt, iż celem pracy jest analiza zmian profili lipidowych, pod uwagę wzięto tylko tę grupę cząsteczek. Na potrzeby niniejszej pracy stworzono listę charakterystycznych pików dla lipidów oraz ich fragmentów. Lista jest oparta o liczne doniesienia literaturowe i przedstawiona została w załączonym ankiecie. Bazą do stworzenia przedstawionej listy były również pomiary wykonane dla wybranych próbek referencyjnych w Instytucie Fizyki UJ. Takie podejście do analizy można zastosować w sytuacji, gdy badania skupione są wokół określonej grupy cząsteczek lub gdy znamy masy i charakterystykę cząsteczek różnicujących badane próbki. W chwili, gdy celem przeprowadzanej analizy jest identyfikacja czynników różnicujących próbki, np. zdrowych od chorych, koniecznym jest zastosowanie bardziej skomplikowanej analizy opartej na złożonych metodach statystycznych, a więc wielowymiarowych analizach danych. Metodami takimi są m.in.: analiza głównych składowych (PCA, ang. *Principal Component Analysis*), analiza skupień (PC, ang. *Partitioning Clustering*) [208, 209].

Uzyskawszy dostateczne intensywności pików dla znanych mas lub intensywności dla mas różnicujących badane próbki, przeprowadza się zazwyczaj analizę porównawczą uzyskanych wyników. Na podstawie doniesień

literaturowych można uznać, iż jest możliwa względna ocena ilościowa zmian np. intensywności dla określonych pików w przypadku pomiaru powierzchni próbek o podobnej charakterystyce, a dokładniej o analogicznych właściwościach jonizacyjnych [210]. Podobny schemat postępowania zaprezentowano w pracy autorstwa Touboul i in. [211]. Według tego schematu, należy wyekstrahować z powierzchni badanej próbki obszary, które będą porównywane, np. różniące się histologicznie, następnie uzyskać dla tych obszarów widma masowe, w kolejnym kroku znormalizować je do takiej samej całkowitej liczby zliczeń dla wybranego obszaru zainteresowania ROI (ang. *Region Of Interest*) i ostatecznie porównywać znormalizowane intensywności dla istotnych pików. Opisane podejście może być stosowane dla próbek różniących się pod różnymi względami, przykładowo w rozróżnieniu próbek od pacjentów zdrowych i chorych. Należy przy tym zaznaczyć, że wszystkie warunki eksperymentalne muszą być takie same, a pomiary wykonane względnie w tym samym czasie [193, 211-214]. Ze względu na bardzo małe powierzchnie analizy, podobną charakterystykę badanych powierzchni oraz fakt identyczności parametrów pomiarowych, uzyskane w ten sposób wyniki dla różnych próbek mogą być porównywane między sobą [213]. Dokładność i prawidłowość metody zwiększa się wraz ze wzrostem liczebności prób, a więc w przypadku gdy do analizy porównawczej zestawiamy średnie wartości dla znormalizowanych intensywności z porównywanych próbek lub obszarów na powierzchni.

Kolejnym istotnym elementem jest analiza statystyczna stosowana podczas wykonywania porównań. Przy porównywaniu średnich w wielu grupach (populacjach) można zastosować analizę wariancji zaproponowaną przez angielskiego biologa i genetyka R.A. Fishera (ANOVA, ang. *ANalysis Of VAriance*). Analiza wariancji ANOVA, mająca szerokie zastosowanie w naukach biologicznych i medycznych, umożliwia ocenę wpływu poziomu określonego czynnika na mierzalną charakterystykę badanego obiektu. W konsekwencji ANOVA bada istotność różnic między grupami doświadczalnymi [215]. W tym przypadku, analiza opiera się na badaniu zmienności międzygrupowej powstałej na skutek różnic powstałych między grupami doświadczalnymi. Zmienność ta wywoływana jest działaniem czynnika doświadczalnego na poszczególne grupy doświadczalne, a wyrażana jest zróżnicowaniem średnich poszczególnych grup doświadczalnych w stosunku do ogólnej średniej. Analiza, w sposób opisowy, sprawdza jak przebiega rozkład stosunku kwadratów odchyłeń międzygrupowych do kwadratu odchyłeń wewnątrzgrupowych. Przy przedstawionej analizie koniecznym jest spełnienie pewnych założeń, mianowicie przy k grupach charakteryzowanych przez zmienną X , zakłada się że zmienne $X_1, \dots, X_k$, przypisane grupom $1, \dots, k$ są niezależne i mają rozkłady normalne, a ich wariancje są homogenne. Sprawdzana hipoteza zerowa stanowi o równości wszystkich średnich, a hipoteza do niej alternatywna, mówi o istnieniu co najmniej jednej pary średnich, które różnią się ze sobą.

Gdy na podstawie analizy wariancji wykazany zostanie wpływ czynnika różnicującego na zmiany badanej cechy można przystąpić do wykonania testów wielokrotnych porównań (tzw. *testy post-hoc*). Takie działanie umożliwi określenie, które z analizowanych grup różnią się w sposób istotny statystycznie. Umożliwia to, wykonanie bardziej szczegółowej analizy badanego zjawiska. Istnieje szereg różnych testów *post-hoc*, których klasyfikatorem jest czułość testu, określona przez prawdopodobieństwo wykrycia rzeczywistych różnic między grupami, oraz popełnienie błędu pierwszego rodzaju, czyli przyjęcia za istotne różnic, które w rzeczywistości nie są istotne statystycznie. Jednym z najczęściej stosowanych testów do porównywania par średnich jest test Tukey'a, będący testem opartym na studentyzowanym rozstępie, a który pozwala wyznaczyć grupy średnich jednorodnych. W przypadku tego testu błąd pierwszego rodzaju jest mniejszy niż przy innych testach, równocześnie gwarantuje równy poziom istotności dla wszystkich porównywanych par.

Przedstawione powyżej podejście do otrzymanych wyników techniką TOF-SIMS jest nowatorskie. W zakresie wiedzy dostępnej autorowi rozprawy opisane powyżej metody analizy nie były dotąd używane w pomiarach SIMS. Pozwalają one na dosyć szczegółową analizę porównawczą otrzymanych wyników w kontekście obserwacji zmian jakościowych.

2.8. TOF-SIMS w badaniach profili lipidowych

W większości metod stosowanych do tej pory w biologii, do badania lipidów w tkankach konieczna jest ekstrakcja tych związków z ich macierzystego układu. W tych przypadkach, zatracona zostaje informacja o przestrzennym umiejscowieniu interesujących nas związków w badanym materiale. W odniesieniu do próbek biologicznych wiedza na temat lokalizacji ważnych biologicznie związków jest niezwykle istotna. W pomiarach TOF-SIMS możliwe jest uzyskanie informacji o przestrzennym rozmieszczeniu biomolekuł z bardzo wysoką rozdzielczością (400 nm – 2 μ m) [216, 217].

Analiza lipidów i ich obrazowanie na powierzchni próbek biologicznych pochodzenia zwierzęcego stanowiły główny przedmiot początkowych zastosowań spektrometrii TOF-SIMS w dziedzinie biologii. Od początku zaimplementowania techniki TOF-SIMS do badań biologicznych, większość prac dotyczyła cholesterolu, witaminy E oraz kwasów tłuszczowych. Powodem tego jest wysoka wydajność emisji jonowej dla tych cząsteczek. Fosfolipidy i sfingolipidy muszą być natomiast skumulowane w danym obszarze aby były widoczne na widmach masowych ze względu na mniejszą intensywność sygnałów. Od początku użycia techniki TOF-SIMS, powstała obszerna biblioteka widm jak również bogata lista charakterystycznych pików pojawiających się w widmach masowych lipidów. Charakterystyka tych pików dla poszczególnych grup lipidowych znajduje się w tabelach znajdujących się w aneksie.

Już w latach dziewięćdziesiątych podjęto pierwsze próby zastosowań tej metody do badań nad próbkami biologicznymi, lecz przeprowadzone

eksperymenty były w większości przypadków ograniczone możliwościami aparaturowymi. Pionierskie wyniki obrazowania lipidów zaprezentowane przez McMahon w 1995 roku [218] dotyczyły analizy fosfatydylocholiny i sfingomieliny w tkankach mózgu świni oraz próbkach nadnerczy pochodzących od psa. Kolejnym przykładem jest identyfikacja cholesterolu we krwi u osób chorujących na zespół Smitha – Lemiego – Opitza, co można potraktować jako początek wykorzystania tej metody w zakresie biomedycyny [219]. W tej dziedzinie uzyskano mapy 2D, o wysokiej rozdzielczości, redystrybucji cholesterolu w ludzkim jelicie po uprzednim podaniu toksyny cholery. Na podstawie tych badań wykazano zwiększoną kumulację cholesterolu w enterocytach kosmków jelitowej tkanki potraktowanej toksyną [220]. Kolejne badania wykazały specyficzną kumulację dwóch typów glikosfingolipidów w próbkach skóry i nerek osób ze zdiagnozowaną chorobą Fabry’ego. Wymienione lipidy gromadziły się w skórze właściwej i w tkance podskórnej. Natomiast, u zdrowych ochotników sygnały pochodzące od lipidów w naskórku były słabe. W dodatku, w przypadku materiału z biopsji nerki zaobserwowano korelację między poziomem intensywności pików, odpowiadających glikosfingolipidom, a stopniem zaawansowania choroby [221].

Użycie konglomeratów jonowych, takich jak Au_n^+ , Bi_n^+ , C_{60}^+ , spowodowały wzrost emisji wtórnych jonów o wyższych masach przy równoczesnym zwiększeniu emisji macierzystych jonów molekularnych [199]. Umożliwiło to analizę i wizualizację 3D skomplikowanych molekuł biologicznych. Jonowe wiązki konglomeratów stworzyły możliwość zobrazowania cholesterolu w komórkach przez Nygrena i in [222], umożliwiły identyfikację cholesterolu, sulfatydów, fosfatydyloinozytolu oraz fosfatydylocholiny oraz były pomocne dla określenia lokalizacji w korze mózdzku szczura cholesterolu oraz fosfocholiny [199, 222-224]. Dzięki zastosowaniu działu emitującego klastry złota (Au_3^+), rozróżniono trzy różne obszary w próbkach nogi myszy na podstawie specyficznej dystrybucji różnych klas lipidów (kwasów tłuszczowych, trójglicerydów, fosfolipidów, tokoferolu, koenzymu Q9 oraz cholesterolu). Badania te pokazały możliwość bezpośredniego zlokalizowania w tkance określonej ilości lipidów, których zawartość może odzwierciedlać stan metaboliczny struktury [211]. Podejmowano również próby przeprowadzenia badań o charakterze ilościowym. Prinz i in. [225] analizując różne grubości modelowych warstw fosfolipidów pokazali mianowicie, iż piki przypisane zjonizowanym molekułom, takim jak dimer 1-oleoyl-2-palmitoil-3-sn-glicero-3-fosfocholiny (POPC), mają różną intensywność w zależności od grubości warstw badanych lipidów. Zasugerował, że występowanie pików świadczących o emisji molekuł może zostać użyte jako czuły wskaźnik zmian w strukturach błony oraz informować o istnieniu dwuwarstwowych struktur błonowych w komórkach i tkankach. W pracy Ostowskiego i in. [226] dokonano rozróżnienia pojedynczych komórek na podstawie składu lipidowego, a konkretnie na przykładzie cholesterolu w zewnętrznych warstwach plazmolemy makrofagów.

Touboul oraz Kollmer [227] przeprowadzili badania witaminy E w aspekcie jej właściwości przeciwutleniających. Wykonali oni szczegółową analizę lokalizacji tokoferolu w mózgu myszy. Ten sam lipid zbadał Monroe w pracy z 2005 roku [228]. Przedstawił on lokalizację tokoferolu w skali sub-komórkowej w błonach pojedynczych, wyizolowanych neuronów z modelowego *Aplysia californica*. Wykonano również obrazowanie kwasów tłuszczowych w siatkówce szczurów, kwasów fosfatydowych w blaszce miazdżycowej, czy też di- i trójglicerydów (DAGs, TAGs) w ludzkiej tkance tłuszczowej [229-231].

Mając zatem na uwadze cel badawczy postawiony w niniejszej pracy, oraz biorąc pod uwagę powyżej przedstawionemu zarysowi wybranych pozycji naukowych można uznać za obiecujący wybór techniki TOF-SIMS do zbadania zmian profili lipidowych w tkankach będących przedmiotem rozprawy.

Część eksperymentalna

Część eksperymentalna rozprawy obejmuje opis całości prac o charakterze doświadczalnym i interpretacyjnym, realizowanych w ramach tematu badawczego rozprawy. Opis przedstawiony jest w trzech rozdziałach, które zawierają wyczerpujące informacje dotyczące materiału biologicznego użytego do badań, przebiegu eksperymentów, zastosowanych metodach badawczych oraz uzyskanych wyników i ich analizy.

Pierwszy rozdział opisuje warunki hodowli i zastosowane żywienie zwierząt będących obiektem badań, procedury związane z preparatyką próbek i ich przechowywaniem. Główna część prac eksperymentalnych była realizowana przy użyciu aparatury TOF-SIMS. W rozdziale podano stosowne parametry aparatury i opisano przebieg eksperymentów. Omówiono również sposób przygotowania danych doświadczalnych, z udziałem statystycznych metod analizy wyników, do charakterystyki układów lipidowych w badanych tkankach. Wszystkie informacje zawarte w tym rozdziale dotyczą dwóch następnych rozdziałów części eksperymentalnej rozprawy.

Prace eksperymentalne realizowano w dwóch cyklach pomiarowych. Pierwszy cykl pomiarów dotyczył badań związanych z zawartością poszczególnych lipidów w tkance mięśniowej *m. pectoralis superficialis* brojlerów Ross 308. Wyniki tych badań przedstawia rozdział drugi. Czynnikiem różnicującym cztery grupy próbek poddanych badaniu w pomiarowym cyklu, było zastosowanie różnego typu źródła tłuszczu w diecie zwierząt. Wzbogacony skład lipidowy mięsa uzyskano dzięki podaniu w paszach zwierząt olejów roślinnych, o specyficznych zawartościach lipidów i kwasów tłuszczowych. Celem opisanych w tym rozdziale badań było wykorzystanie techniki TOF-SIMS do analizy różnic w profilach lipidowych tkanek mięśnia piersiowego (*m. pectoralis superficialis*) brojlerów objętych różnymi programami żywieniowymi.

Zaobserwowane w tym cyklu prac doświadczalnych wyniki wykazały między innymi, iż przy użyciu czynnika żywieniowego możliwe jest sterowanie profilami lipidowymi w mięsie brojlerów, co może posłużyć do uzyskania mięsa o właściwościach „żywności funkcjonalnej”, cechującego się między innymi wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów ω -6 i ω -3 w proporcjach zalecanych dla zdrowia człowieka.

Trzeci rozdział poświęcony jest wynikom uzyskanym w drugim cyklu prac doświadczalnych. Eksperymenty przeprowadzono na fragmentach mięśni, dla których czynnikiem doświadczalnym był czas, pomiędzy ubojem zwierząt a analizą mięśni przechowywanych w chłodniczych warunkach. Wyodrębniono trzy interwały czasowe, po których odpowiednia grupa próbek została w taki sam sposób przygotowana i poddana eksperymentalnej analizie. Jakość produktów mięsnych jest warunkowana wieloma czynnikami, między innymi wartością odżywczą, właściwościami funkcjonalnymi, ale i cechami sensorycznymi. W dobie

powszechnego dostępu do produktów mięsnych ważnym czynnikiem, w dużym stopniu decydującym o jakości mięsa, jest czas i warunki jego przechowywania. Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu czasu przechowywania chłodniczego na skład lipidowy mięsa kurcząt brojlerów, dokonana przy zastosowaniu techniki TOF-SIMS.

Ze względu na fakt, iż utlenione formy poszczególnych lipidów w mięsie bezpośrednio rzutują na jego jakość i przydatność do spożycia, niezwykle przydatna staje się wiedza kiedy i w jakim stopniu zachodzi proces utleniania w strukturze tkankowej. Informacje te, mogą następnie posłużyć do dokładnego określenia 'bezpiecznego' czasu przechowywania produktów pochodzenia zwierzęcego, w celu minimalizacji zagrożeń wynikających z konsumpcji żywności o wysokiej zawartości utlenionych form lipidowych (np. oksysteroli). Z tych powodów, otrzymane w niniejszym eksperymencie wyniki wnoszą cenne informacje o zmianie profili lipidowych w trakcie przechowywania chłodniczego i mogą stanowić dobry prognostyk do dalszych badań techniką TOF-SIMS w tej tematyce.

3. Materiały i metody

3.1. Hodowla i żywienie zwierząt

W pierwszym cyklu prac doświadczalnych, a więc w analizie dotyczącej wpływu zastosowania różnego typu źródła tłuszczu w diecie zwierząt na zawartość poszczególnych lipidów w tkance mięśniowej, materiał do badań stanowiły mięśnie piersiowe powierzchniowe (*m. pectoralis superficialis*) szybko rosnących kurcząt brojlerów Ross 308. Zwierzęta utrzymywano na fermie doświadczalnej Instytutu Zootechniki PIB w Balicach. Materiałem doświadczalnym było sześćset osiem jednodniowych, indywidualnie zważonych i oznakowanych piskląt (kogutków), które przydzielono losowo do 16 oddziałów, po 38 osobników. W każdym oddziale wyodrębniono po cztery grupy, dla których wprowadzono odmienny plan żywieniowy. Kurczęta brojlerów odchowywano w bezokiennym budynku, na ściółce, w przedziałach, do 42 dnia życia. Wszystkim brojlerom zapewniono jednakowe, optymalne, elektronicznie sterowane warunki środowiskowe (temperaturę, wilgotność względną, program świetlny) oraz swobodny dostęp do paszy i wody. Podczas całego eksperymentu każdą z czterech grup badawczych żywiono pełnoporcjowymi granulowanymi mieszankami paszowymi, które zmieniano wraz ze wzrostem i rozwojem zwierząt.

Dieta dla drobiu hodowanego w głównej mierze oparta jest na zbożach dostarczających niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny ω -6 i nieznaczne ilości kwasów z rodziny ω -3. Od urodzenia do 21 dnia życia podawano mieszankę paszową, tzw. „starter”, następnie od 22 do 35 dnia życia „grower” i ostatecznie do 42 dnia „finisher”. Wymienione diety w swoim składzie zawierały określone proporcje składników pokarmowych. Odpowiednio w „starter” 22%, „grower” 20,5% oraz w „finisher” 20,5% surowego białka oraz odpowiednio po 2990 kcal/kg (12,5 kJ), 3130 kcal/kg (13,1 kJ) i 3130 kcal/kg (13,1 kJ) energii metabolicznej (Drobin Nutrition Standards, 2005). W podstawowej diecie zwierzęta otrzymywały odpowiednią ilość tłuszczu. Źródło pochodzenia tłuszczu różniło się dla każdej badanej grupy oraz miało inną proporcję w zależności o wieku brojlerów. Mianowicie, proporcje tłuszczu w diecie podstawowej w zależności od wieku wynosiły odpowiednio: 2,9%, 4,8% oraz 4,8%. Źródłem tłuszczu w pierwszej grupie (grupa I) był olej sojowy bogaty w kwas linolowy, w którym występuje przewaga PUFA ω -6. Druga grupa (grupa II) otrzymywała tłuszcz w postaci oleju lnianego, który stanowi źródło kwasu linolenowego, ω -3. Trzecią badaną grupę (grupa III) karmiono mieszanką dwóch olejów, lnianego i sojowego, w proporcji 44%:56%, która odpowiada równej ilości obu tłuszczu w mieszance. Brojlery w grupie kontrolnej (grupa IV) karmiono paszą z dodatkiem łożu wołowego, który jest powszechnie wykorzystywany w masowej produkcji komercyjnej, z tego względu grupa ta traktowana jest jako referencyjna. Codziennie, w trakcie hodowli zwierząt, kontrolowano masę każdego brojlera, spożycie paszy oraz liczbę padłych osobników. Po zakończonym odchowie, w 42

dniu życia wybrano po dziesięć osobników z każdej grupy doświadczalnej o masie ciała zbliżonej do średniej w grupie ($2,9 \pm 0,9$ kg). W celu przygotowania próbek do pomiarów spektrometrią masową oraz do analizy mikrostrukturalnej wybrano losowo po cztery osobniki z każdej grupy żywieniowej.

Eksperymenty dotyczące wpływu czasu przechowywania mięśni w warunkach chłodniczych (4°C) na skład lipidowy tkanki mięśniowej (*m. pectoralis superficialis*), a więc drugi cykl prac doświadczalnych, przeprowadzono na kurczętach brojlerach Ross 308 utrzymywanych w standardowych warunkach na fermie drobiu w Zalesianach (Gdów, powiat Wielicki). W dniu przyjęcia na fermę pisklęta zważono, skontrolowano ogólny stan zdrowia i kondycji oraz podano paszę - mieszankę treściwą typu „starter”. W trakcie odchowu stosowano następujące mieszanki paszowe granulowane:

- mieszanka typu „starter”, od pierwszej do 7 doby życia,
- mieszanka typu „grower I”, od 8 do 19 doby życia,
- mieszanka typu „grower II”, od 20 do 32 doby życia,
- mieszanka typu „finisher”, od 33 doby życia do uboju (42 dzień życia).

Mieszanki te, pochodziły z wytwórni pasz Cargill Feed & Nutrition Poland Sp. zo.o w Ropczycach. Paszę i wodę podawano *ad libitum* przez cały cykl produkcyjny, przy jednoczesnej ciągłej kontroli ilości podawanej paszy (kg/dobę) oraz zużycia wody (litrów/dobę). Proces podawania pasz odbywał się paszociągami i był sterowany automatycznie. Woda, którą poiono kurczęta pochodziła z sieci miejskiej i spełniała normy wody pitnej dla ludzi (Dz. U. Nr 61, poz. 417). Wysokość zawieszenia poidel regulowano stopniowo wraz ze wzrostem kurcząt w celu ułatwienia pobierania wody. W trakcie tuczu nie stosowano programu świetlnego - brojlery były doświetlane światłem sztucznym przez całą dobę.

W 42 dniu życia wybrano 4 osobniki o średniej masie ciała ($2,7 \pm 0,6$ kg), z których uzyskano próbki poddane analizie TOF-SIMS oraz analizie mikrostrukturalnej.

3.2. Przygotowanie próbek

Do badań mikrostrukturalnych oraz analizy TOF-SIMS, od wszystkich analizowanych kurcząt z doświadczenia żywieniowego, w pierwszym cyklu prac doświadczalnych, z lewej części tuszki w 15 minucie *post mortem* pobierano fragmenty mięśni piersiowych powierzchniowych (*m. pectoralis superficialis*) o wymiarach $\sim 1\text{ cm}^3$. Pobrane fragmenty mięśni mrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -86°C . Podobnie postępowano w drugim cyklu prac doświadczalnych, a więc analizie wpływu czasu przechowywania mięśni w warunkach chłodniczych (4°C) na skład lipidowy tkanki mięśniowej. W tym przypadku, 24 godziny po uboju, z lewej części tuszki pobierano fragmenty mięśni piersiowych (1 cm^3). Dodatkowo, fragmenty tkanek pobierano także po 48 h oraz 72 h przechowywania mięsa w warunkach chłodniczych. Preparatyka próbek po każdym odstępie czasowym przebiegała

według tej samej procedury. Pobrane tkanki mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -86°C . W kolejnym etapie, materiał histologiczny przyklejano do holderów za pomocą medium do tkanek mrożonych OCT Embedding Matrix firmy CellPath, a następnie krojono w kriostacie typu Slee Mev (Niemcy) w temperaturze -20°C , na seryjne skrawki (w poprzek włókien mięśniowych) grubości $10\text{ }\mu\text{m}$. W przypadku analizy TOF-SIMS doniesienia literaturowe wskazują, iż dla płaskich próbek otrzymuje się lepsze wyniki niż w przypadku próbek o nierównej, chropowatej powierzchni. Badania wykonane na cienkich skrawkach (do około $10\text{ }\mu\text{m}$) charakteryzują się dodatkowo mniejszym efektem matrycy [232]. Skrawki mrożeniowe naklejano na szkiełka podstawowe typu Star-Frost, a następnie przechowywano w warunkach próżniowych w temperaturze -86°C . Wykonano dwa seryjne preparaty mrożeniowe, z których jeden wykorzystano do analizy TOF-SIMS, natomiast drugi do wybarwienia tłuszczu śródmięśniowego. Reakcja wybarwiania tłuszczu śródmięśniowego została przeprowadzona na świeżych, nieutrwalonych skrawkach przy użyciu alkoholowego roztworu czerwieni oleistej 'Oil Red O' firmy Sigma [233]. Przebieg procedury:

- barwienie czerwienią oleistą 'Oil Red O' (Sigma) - 10 minut,
- płukanie w wodzie destylowanej - 2 minuty,
- podbarwianie hematoksyliną Erlicha – 5 minut,
- płukanie w wodzie bieżącej – 15 minut,
- zamykanie w glicerol-żelu (Sigma).

Tak przygotowane preparaty analizowano w mikroskopie świetlnym NIKON E600 (Japonia).

Bezpośrednio przed analizą TOF-SIMS, preparaty mrożeniowe suszono w eksykatorze w temperaturze pokojowej przez okres 1 h. Czas suszenia próbki zamrożonej jest zależny od typu materiału, grubości tkanki oraz jej powierzchni. Jak wskazują dane literaturowe czas suszenia tkanek może wynosić od kilku godzin do kilku dni w zależności od rodzaju tkanek [232, 234]. Sjövall i in. [204] oraz Jones i in. [235] sugerują, iż np. cholesterol może zostać całkowicie utracony podczas długotrwałej liofilizacji. Stąd też, suszenie preparatów w prezentowanych badaniach ograniczono do okresu 1 godziny. Pomimo tego, że w trakcie suszenia, a konkretnie w trakcie usuwania wody, następuje strukturalna deformacja oraz powstają artefakty związane z przemieszczaniem się jonów (tj. Na^+ oraz K^+), wiele dotychczas przeprowadzonych badań wskazuje, że taki sposób preparatyki próbki jest właściwy w przypadku badań prowadzonych przy użyciu spektrometrii masowej [236-238].

3.3. Pomiary TOF-SIMS

Wszystkie pomiary, których analiza jest przedmiotem części doświadczalnej prezentowanej rozprawy, wykonano na systemie dynamicznej i statycznej spektrometrii mas wtórnych jonów z analizatorem czasu przelotu TOF-SIMS 5

(ION-TOF GmbH, Münster, Niemcy), znajdującym się w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jako źródło pierwotnych jonów zastosowano działło bizmutowe LMIG. W przypadku wszystkich wykonanych pomiarów jonami bombardującymi powierzchnie próbek były klastry Bi_3^+ . Wybór takiego działła został podyktowany analizą danych literaturowych oraz przeprowadzonych pilotażowych, porównawczych pomiarów próbek lipidów referencyjnych, które wykonano na spektrometrze TOF-SIMS w Instytucie Fizyki UJ. [185, 234].

Jony pierwotne bombardowały badane powierzchnie z energią 30 keV pod kątem 45° do powierzchni próbki, którą umiejscowiono na specjalnym uchwycie (holderze). Górna granica zakresu masowego podlegającego analizie wynosiła 900 amu. Ciśnienie gazów resztkowych w komorze spektrometru utrzymywano na poziomie 10^{-10} mbar w trakcie wykonywania pomiarów.

Spektrometr TOF-SIMS 5 może pracować w różnych modach w zależności od potrzeb eksperymentatora. W przypadku przedstawionych w tej pracy wyników, analiza składu powierzchniowego była wykonywana w statycznym modzie pracy spektrometru. Umożliwia on otrzymanie szczegółowej informacji o składzie chemicznym powierzchni badanego materiału. Statyczny charakter pomiaru widm był potwierdzony liniową zależnością liczby zliczeń dla charakterystycznych pików w funkcji dozy wiązki pierwotnej. W celu neutralizacji powstającego ładunku na powierzchni próbki, w przerwie między dwoma impulsami pochodzącymi ze źródła pierwotnych jonów, zastosowano niskoenergetyczne działło elektronowe. W obrębie każdego cyklu prac doświadczalnych przeprowadzone eksperymenty wykonano w tym samym czasie i takich samych warunkach.

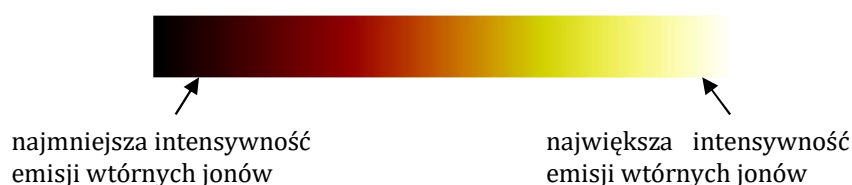
Do analizy TOF-SIMS preparatów pochodzących od zwierząt objętych różnymi programami żywieniowymi wykorzystano uchwyt, na którym umieszczono równocześnie 16 skrawków tkankowych, po cztery ze wszystkich czterech grup pomiarowych. W pierwszym kroku wykonano analizę powierzchniową na obszarze $500 \times 500 \mu m^2$ dla ujemnie oraz dodatnio naładowanych wtórnych jonów. Wyniki przeprowadzonych analiz w przypadku pierwszego cyklu prac doświadczalnych odnoszą się głównie do ujemnie naładowanych jonów, za wyjątkiem części omawiającej sterole, dla których przedstawiono analizę jonów dodatnich. Powodem takiego postępowania były zbyt niskie intensywności charakterystycznych pików mierzonych w polaryzacji dodatniej. Jedynie w przypadku cholesterolu, reprezentującego grupę steroli, piki otrzymane w polaryzacji dodatniej charakteryzowały się znacząco wyższymi intensywnościami w stosunku do pików znajdujących się na widmach w polaryzacji ujemnej. W trakcie wykonywania pomiarów na bieżąco obserwowano mapy 2D sygnałów pochodzących od cholesterolu i fosfatydylocholiney w celu identyfikacji obszarów charakterystycznych dla tłuszczu śródmięśniowego i włókien mięśniowych.

W drugim cyklu prac doświadczalnych, w którym badano wpływ czasu przechowywania chłodniczego, do analizy zastosowano uchwyt, na którym umieszczono cztery szkiełka laboratoryjne, po jednym dla każdego wybranego

osobnika. Na każdym szkiełku laboratoryjnym znajdowały się po trzy skrawki mięśni piersiowych, co w sumie dało 12 próbek do pomiaru spektrometrycznego. Wszystkie przeprowadzone analizy wykonano dla jonów dodatnich, analizowane powierzchnie miały wymiar $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ oraz 256×256 pikseli.

Kalibrację każdego zmierzonego widma wykonano za pomocą sygnałów zidentyfikowanych od następujących jonów dodatnich: H^+ , H_2^+ , CH^+ , CH_2^+ , CH_3^+ oraz $C_3H_2^+$, natomiast w przypadku widm jonów ujemnie naładowanych za pomocą pików C^- , CH^- , CH_2^- , C_2^- , C_2H^- [239].

Obrazy 2D uzyskane metodą TOF-SIMS posiadają 256 odcieni szarości. Odcień o indeksie 0 (czarny) odpowiada najmniejszej intensywności, natomiast odcień 255 (biały) odpowiada maksymalnej intensywności emisji wtórnych jonów. Wszystkie pozostałe intensywności mieszczące się w tym zakresie są odpowiednio przypisane stosując zależność liniową. W celu poprawy czytelności obrazów dla wszystkich zaprezentowanych map 2D zastosowano taką samą paletę kolorów:

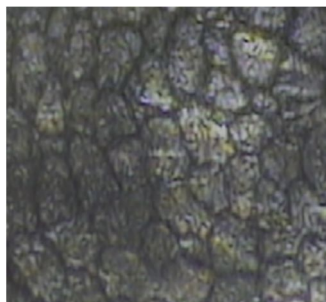


Wszystkie wyniki edytowano i analizowano w programie SURFACELAB 6.3 (ION-TOF GmbH, Münster, Niemcy).

3.4. Przygotowanie danych

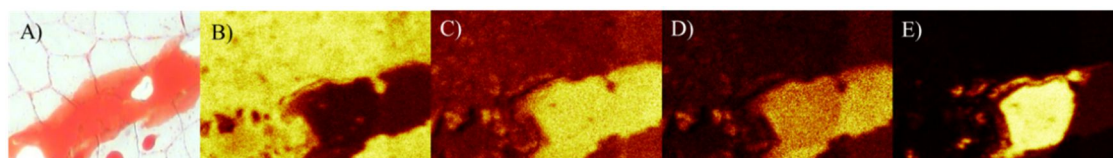
Wynikiem wszystkich przeprowadzonych powierzchniowych analiz było każdorazowo widmo masowe zmierzone na powierzchni $500 \times 500 \mu\text{m}^2$. W celu przeprowadzenia analizy porównawczej, dla obu cykli prac doświadczalnych, otrzymane dane poddano opisanej poniżej obróbce.

W pierwszym cyklu prac doświadczalnych dla każdego, otrzymanego skrawka preparatu wykonano po cztery pomiary. Tak dobierano analizowane miejsce, aby na badanej powierzchni znajdowały się obszary tłuszczu śródmięśniowego oraz włókien mięśniowych. Podczas pomiaru eksperymentator ma do dyspozycji obraz próbki uzyskany z kamery CCD (**Rys. 8**) nie mniej jednak, obraz ten nie pozwala na szczegółowe rozróżnienie miejsc występowania obu struktur.



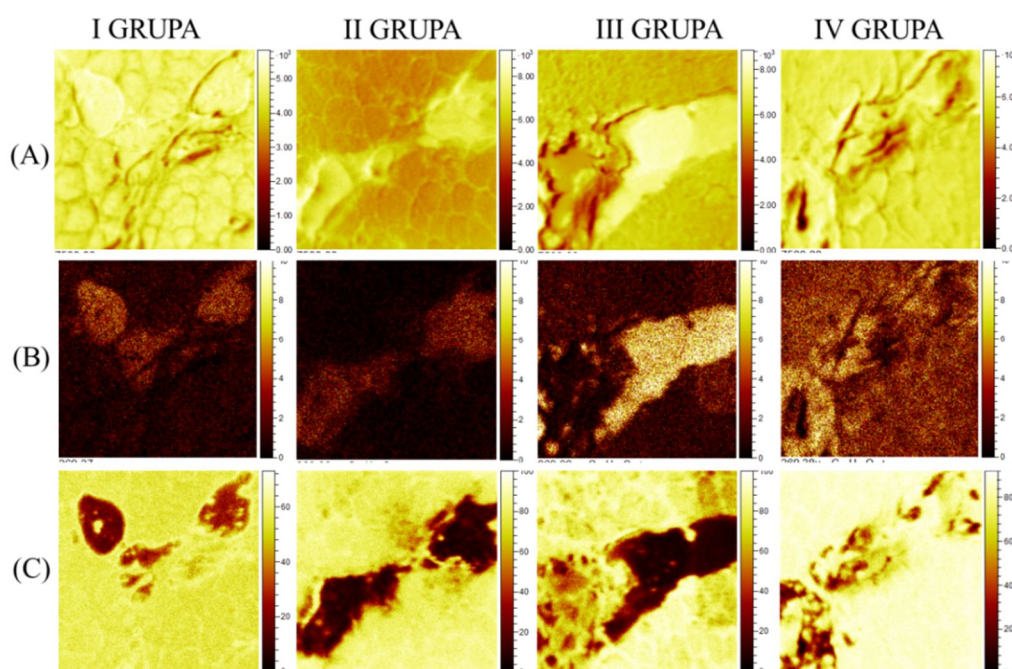
Rys. 8. Zdjęcie z kamery CCD tkanki badanej metodą TOF-SIMS.

Trudność w identyfikacji poszczególnych obszarów na obrazie CCD jest powodem, dla którego w trakcie analizy SIMS obserwowano mapę dystrybucji jonu pochodzącego od cholesterolu (masa m/z 369) oraz jonu charakterystycznego dla fosfatydylocholiny (masa m/z 184). Do identyfikacji obszarów włókien mięśniowych oraz tłuszczu śródmięśniowego, posłużyły również seryjne preparaty histologiczne z wybarwionym tłuszczem czerwienią oleistą. Przykładowe zestawienie obrazu histologicznego oraz obrazów ilustrujących sygnały wybranych jonów umieszczono na **Rys. 9**.



Rys. 9. A) obraz z mikroskopu świetlnego fragmentu mięśni piersiowych kurcząt brojlerów Ross 308 – barwienie tłuszczu czerwienią oleistą. B)–E) obrazy emisji wtórnych, dodatnie naładowanych jonów z powierzchni $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ z mięśni piersiowych kurcząt brojlerów Ross 308. B) m/z 59,08; C) m/z 109,12; D) m/z 339,34; E) m/z 579,60.

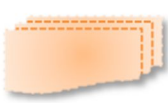
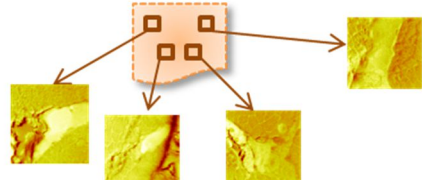
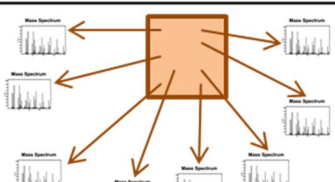
Obrazy na **Rys. 10** przedstawiające przykłady map 2D, charakteryzuje występowanie dwóch komplementarnych obszarów. Regiony o wysokim sygnale jonu cholesterolu [jaśniejsze miejsca w wierszu (B)] to obszary tłuszczowe, zaś miejsca, dla których widoczna jest wysoka intensywność jonu fosfatydylocholiny [jaśniejsze miejsca w wierszu (C)] wskazują obecność włókien mięśniowych.



Rys. 10. Wybrane obrazy TOF-SIMS emisji ujemnie naładowanych jonów z powierzchni $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ pochodzące z mięśni piersiowych kurcząt brojlerów Ross 308. (A) sygnał od wszystkich wyemitowanych jonów, (B) zliczenia jonu charakterystycznego dla cholesterolu, o m/z 385,4 oraz (C) zliczenia charakterystycznego jonu fosfatydylocholiny, 123 amu.

Po wykonaniu pomiarów na dużych powierzchniach ($500 \times 500 \mu\text{m}^2$), manualnie wybrano z każdej pojedynczego obszaru po 4 miejsca o wielkości

50×50 μm^2 charakterystyczne dla tłuszczu śródmięśniowego i odpowiednio 4 obszary dla włókien mięśniowych. **Rys. 11** ukazuje pełną metodykę analizy, w efekcie której otrzymano pojedyncze widmo do dalszej analizy porównawczej.

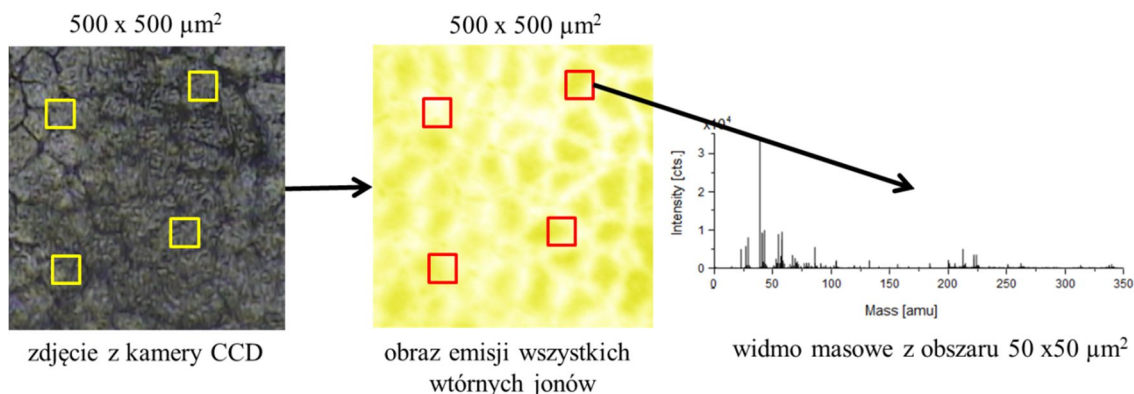
GRUPA	GRUPA I	GRUPA II	GRUPA III	GRUPA IV
Dieta	Pasza podstawowa + olej sojowy (OS)	Pasza podstawowa + olej lniany (OL)	Pasza podstawowa + 56% OS 44% OL	Pasza podstawowa + łój wołowy (BT)
Do analizy ToF-SIMS	4 osobniki z każdej grupy = 4 skrawki tkankowe z każdej grupy  16 skrawków tkankowych			
Dla każdego skrawka tkankowego	Dla pojedynczego skrawka wykonano 4 pomiary 500 x 500 μm^2  64 pomiary obszaru 500 x 500 μm^2			
ROI (Region Of Interest)	Z pojedynczego pomiaru 500 x 500 μm^2 wybrano 4 charakterystyczne obszary dla tłuszczu i taką samą liczbę dla włókien mięśniowych, powierzchnia analizy to 50 x 50 μm^2 . Dało to po 64 pomiary dla każdej grupy w przypadku tłuszczu śródmięśniowego oraz w przypadku włókien mięśniowych. 			

Rys. 11. Schemat procedury otrzymania pojedynczego widma z obszaru tłuszczu śródmięśniowego i obszaru włókien mięśniowych.

Jak wynika z przedstawionego schematu, dla każdej badanej grupy do analizy porównawczej otrzymano 64 widma pochodzące z obszarów tłuszczu śródmięśniowego oraz taką samą liczbę widm z regionów charakterystycznych dla włókien mięśniowych. Opisaną metodykę zastosowano w przypadku jonów ujemnych dla większości grup lipidowych, za wyjątkiem grupy steroli dla której wykonano analizę w polaryzacji dodatniej. Następnie, każdą otrzymaną intensywność, będącą scałkowaną powierzchnią pod krzywą charakterystycznego piku, znormalizowano do całkowitej ilości zliczeń dla danego widma z obszaru 50×50 μm^2 .

Drugi cykl prac doświadczalnych, w którym badano wpływ przechowywania chłodniczego na zmianę profili lipidowych, obejmował trzy interwały czasowe przechowywania mięsa. Dla każdego osobnika, spośród wybranych czterech, przygotowano po 3 preparaty dla okresu 24 h, 48 h oraz 72 h po uboju. Analizę obszaru 500×500 μm^2 przeprowadzono na każdej próbce trzykrotnie, w różnych miejscach. W konsekwencji, dla każdego odstępu

czasowego otrzymano 9 pomiarów, w przypadku każdego jednego wybranego osobnika. Wszystkie pomiary wykonano dla jonów dodatnich. **Rys. 12** prezentuje procedurę, jaką zastosowano następnie do otrzymania pojedynczego widma z obszaru włókien mięśniowych o powierzchni $50 \times 50 \mu\text{m}^2$.



Rys. 12. Metodyka otrzymania widma masowego z obszaru $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, pokazana na pojedynczym pomiarze próbki z I grupy doświadczalnej (24 h po uboju).

Jak pokazuje powyższy rysunek, z każdego pojedynczego pomiaru na obszarze $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ wybrano po 4 mniejsze obszary, o powierzchni $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. W ten sposób otrzymano 4 widma masowe z obszarów obejmujących włókna mięśniowe lub obszary tłuszczu śródmięśniowego. Reasumując, dla każdego okresu przechowywania mięsa (24 h, 48 h oraz 72 h po uboju) otrzymano 144 widma do analizy porównawczej (dla każdego odstępu czasowego 4 osobniki, dla każdego osobnika po 9 pomiarów $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, z każdego obszaru wybrano 4 powierzchnie $50 \times 50 \mu\text{m}^2$).

3.5. Analiza statystyczna wyników

Wyniki przeprowadzonych pomiarów poddano następnie analizie statystycznej, określając wartości średnie, odchylenia standardowe dla danej grupy oraz jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. O istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi dla grup wnioskowano na podstawie testu Tukey'a.

Oдноśnie badania wpływu żywności na zmianę profili lipidowych, w pierwszym cyklu prac doświadczalnych, występowały $k = 4$ grupy (populacje) oraz $N_1 = \sum_{i=1}^k n_i = 64 \cdot 4 = 256$ niezależnych prób. Natomiast w drugim cyklu prac doświadczalnych, występowały $k = 3$ populacje, a liczba wszystkich niezależnych prób wyniosła $N_2 = \sum_{i=1}^k n_i = 144 \cdot 3 = 432$. Do przeprowadzenia testów przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$. Parametr ten określa maksymalne, akceptowalne ryzyko błędu, co oznacza maksymalne, dopuszczalne prawdopodobieństwo popełnienia błędu odrzucenia hipotezy zerowej będącej w rzeczywistości prawdą. W pierwszym kroku analizy danych sprawdzono jednorodność wariancji testem Levene'a, którego hipoteza zerowa (H_0) zakłada, iż wariancje w różnych grupach są jednorodne. Decyzję o odrzuceniu lub

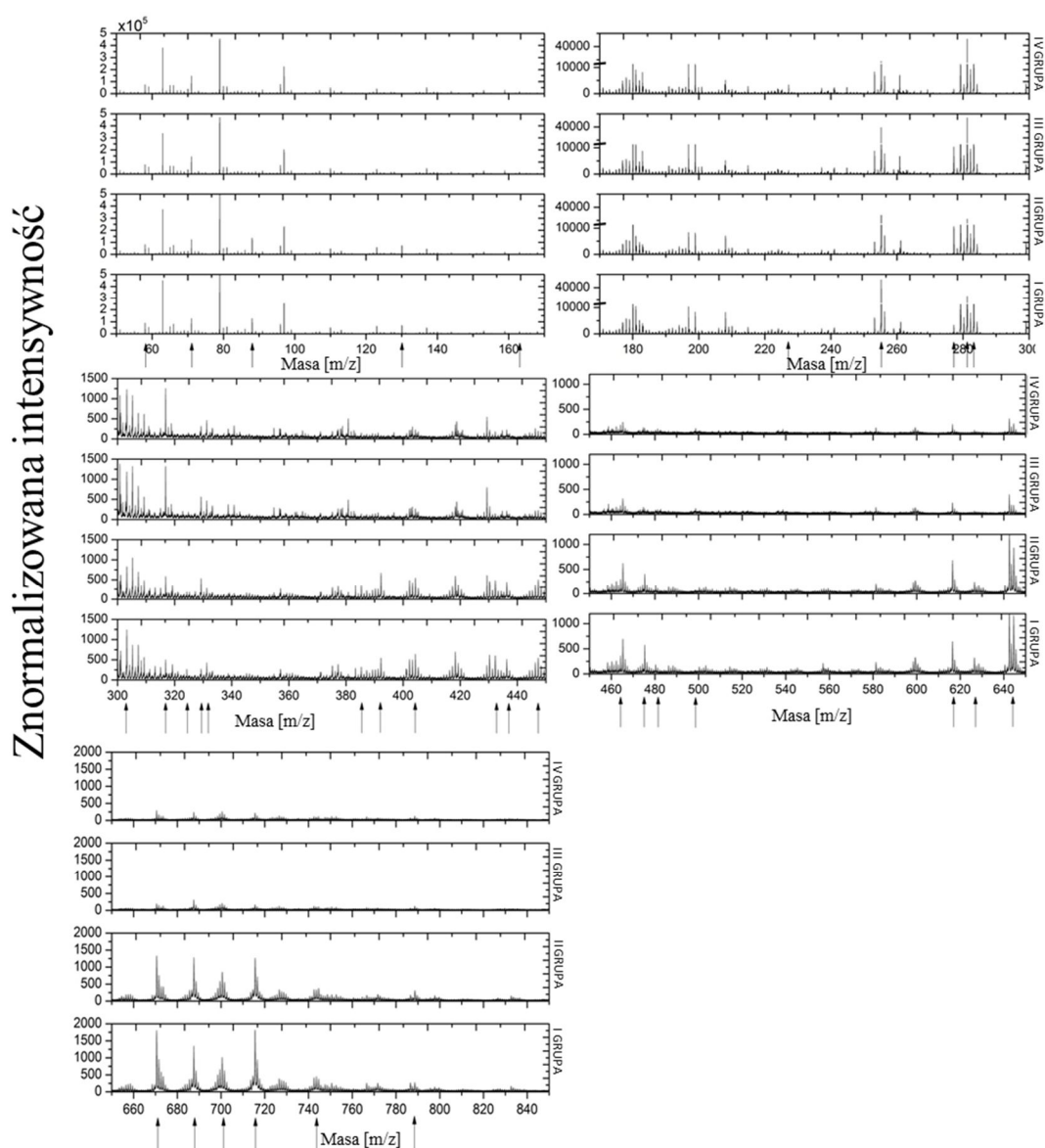
podtrzymaniu H_0 podjęto porównując wartość p z ustalonym poziomem istotności, gdzie dla $p \leq \alpha$ hipoteza H_0 zostaje odrzucona, w innym przypadku nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej. Parametr p definiowany jest jako testowe, kumulative prawdopodobieństwo wylosowania próby takiej, lub bardziej skrajnej, jak zaobserwowana, z założeniem spełnienia hipotezy zerowej. Statystykę F (Fischera-Snedecora) o $k - 1$ i $n - k$ stopniach swobody, na przyjętym poziomie istotności, użyto do sprawdzenia istotność różnic między średnimi. W tym celu, dla każdej porównywanej wartości obliczono współczynnik F będący wartością stosunku próbkowych wariancji dwóch porównywanych zbiorów prób.

Dla podanej wartości stopni swobody odczytano z tablic wartości krytyczne rozkładu F -Snedecora, $F(k - 1, N - k)$. Wartość krytyczna dla pierwszego cyklu prac doświadczalnych miała wartość $F(3, 252) \cong 2,65$, natomiast dla drugiego cyklu prac doświadczalnych wartość wynosiła $F(2, 429) \cong 3,01$. W przypadku wartości większej od odczytanej z tablicy przyjęto istotny statystycznie wpływ czynnika różnicującego na wartości średnie, wyniki tej analizy przedstawia współczynnik F_1 . Dla charakterystycznych pików określonych związków lipidowych, dla których analiza wariancji wykazała różnicę istotną statystycznie wykonano następnie test wielokrotnych porównań. Zastosowano test Tukey'a, który dokładnie wskazał grupy różniące się między sobą w sposób istotny statystycznie. W niniejszej rozprawie rezultaty przeprowadzonych testów *post-hoc* opisane zostały małymi literami alfabetu, gdzie taka sama litera przypisana dla różnych grup oznacza brak znaczącej statystycznie zmiany, natomiast różne litery świadczą o występujących istotnych statystycznie różnicach.

W przypadku pierwszego cyklu prac doświadczalnych dla trzech najbardziej znaczących kwasów tłuszczowych, z perspektywy przeprowadzonego eksperymentu żywieniowego, wykonano dodatkowo analizę wariancji ANOVA odnoszącą się do różnic w występowaniu poszczególnych lipidów w obrębie pojedynczej grupy. Są nimi kwasy oleinowy, linolowy oraz linolenowy. Druga z przeprowadzonych analiz ANOVA, ma na celu przedstawienie zmiany w profilach lipidowych wybranych lipidów w obrębie danej grupy żywieniowej. W tym przypadku wyniki analizy przedstawia współczynnik F_2 . Wartości krytyczne dla tej analizy zmieniały się w zależności od ilości charakterystycznych pików lipidów poddanych analizie i zostały podane w opisie tabel w dalszej części pracy. Wykonana analiza jest możliwa ze względu na zbliżone masy rejestrowanych jonów oraz niezmienny układ pomiarowy, co może świadczyć o zbliżonym współczynniku jonizacji dla trzech istotnych cząsteczek: kwasu oleinowego, linolowego i lnianego [175].

4. Wpływ żywienia na profile lipidowe

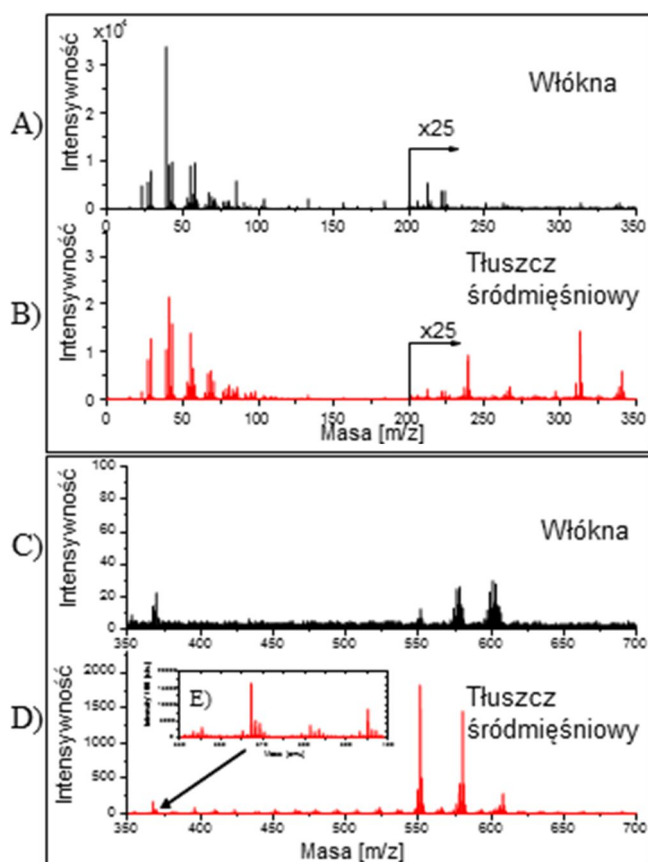
Przed wykonaniem szczegółowej analizy wyników dotyczących wpływu zastosowanej diety na profile lipidowe, w pierwszym kroku, po otrzymaniu widm masowych z powierzchni $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ dla wszystkich analizowanych próbek, wybrano po jednym widmie dla próbki z każdej grupy żywieniowej i zestawiono je razem. Zestawienie widm zaprezentowane jest na **Rys. 13**. Zestawienie to ma na celu obserwację czy występują znaczące różnice pomiędzy poziomami intensywności poszczególnych pików dla czterech badanych grup. Wystąpienie takich różnic jest bezpośrednim dowodem, że rodzaj stosowanej diety znajduje swe odbicie w charakterystycznych cechach danego widma masowego.



Rys. 13. Widma TOF-SIMS ujemnych jonów w przedziale masowym m/z : 50 – 850 dla próbek z czterech grup żywieniowych. Emisja jonów z powierzchni $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. Strzałkami zaznaczono piki odpowiadające wybranym kwasom tłuszczowym, dla których występuje widoczna różnica w poziomach intensywności.

Widma umieszczone na rysunku charakteryzują się bardzo dużą ilością pików, co jest ogólną cechą widm masowych pochodzących z biologicznych próbek. Z łatwością można dostrzec różnice między widmami rejestrowanymi dla poszczególnych grup żywieniowych. Zmiany w widmach uwiadcniają się dla cząstek o masach powyżej 300 amu, a dla cząstek o masach przewyższających 600 amu są już już jaskrawo widoczne.

Na **Rys. 14** przedstawiono widma TOF-SIMS ujemnych jonów z próbki należącej do I grupy żywieniowej z dwóch obszarów powierzchni, włókien mięśniowych i tłuszczu śródmięśniowego. W odróżnieniu od wyników pokazanych na poprzednim rysunku, badane obszary były 100 razy mniejsze, ich rozmiary wynosiły $50 \times 50 \mu\text{m}^2$.

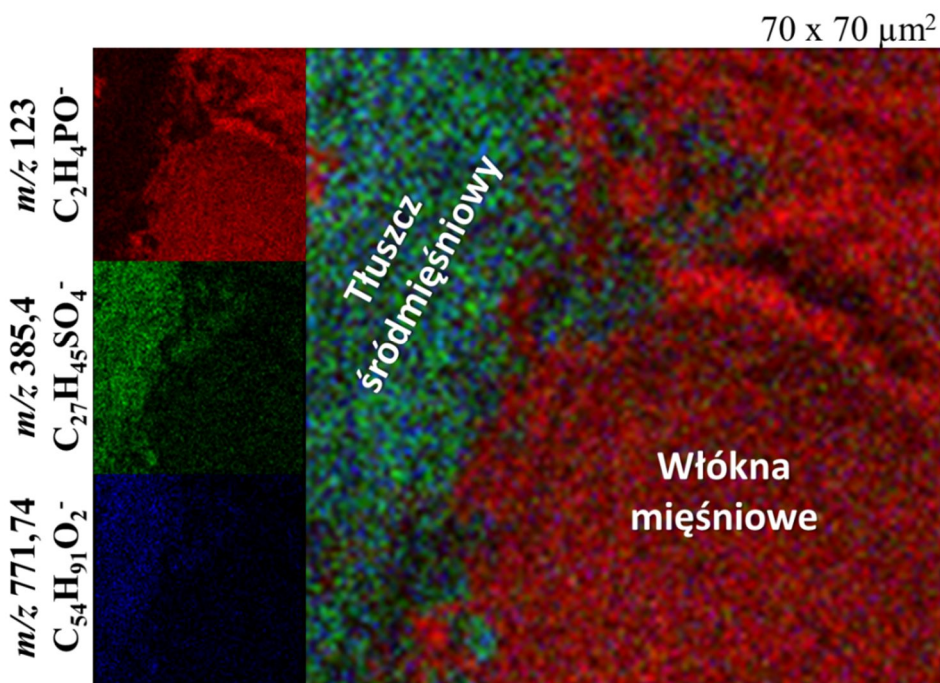


Rys. 14. Widma TOF-SIMS ujemnych jonów emitowanych z powierzchni $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ tkanki pochodzącej z I grupy. Widma A) i C) pochodzą z obszarów włókien mięśniowych, zaś B) i D) z obszaru tłuszczu śródmięśniowego. Widma A) i B) obejmują zakres mas 0-350 m/z , a C) i D) obszar 350-700 m/z . Widma zawierają charakterystyczne piki wielu lipidów, w tym także cholesterolu E).

W całym zakresie mierzonych mas, widoczna jest wyraźna różnica pomiędzy widmem z obszaru włókien mięśniowych, a widmem tłuszczu śródmięśniowego. W zakresie od m/z 0 do 350, widoczny jest wzrost sygnału fosfatydylocholiny (m/z 184) w przypadku włókien mięśniowych. Dla większych mas zauważalna jest obecność wielu pików o dużej intensywności,

charakterystycznych dla cząstek pochodzących od struktur lipidowych. Dla przykładu, w zakresie m/z 500 – 600 widoczne są sygnały charakterystyczne dla ceramidów i diglicerydów. Dodatkowo, wyekstrahowany fragment widma (E) ukazuje charakterystyczne piki cholesterolu.

Wraz z możliwościami jakie daje aparatura TOF-SIMS do powierzchniowego mapowania określonego związku molekularnego, istnieje również możliwość zobrazowania wzajemnej lokalizacji kilku składników molekularnych na analizowanej powierzchni. Dla przykładu, na **Rys. 15** zaprezentowano obraz powstały ze złożenia trzech indywidualnie otrzymanych map 2D określających powierzchniowy rozkład fosfatydylocholiny i cholesterolu w obszarach tłuszczu śródmięśniowego i włókien mięśniowych próbek uzyskanych z mięśni piersiowych brojlerów IV grupy. Mapowania przeprowadzono dla charakterystycznego jonu fosfatydylocholiny o m/z 123 oraz dwóch jonów cholesterolu: m/z 385,4 i m/z 771,74. Jonowym sygnałom przypisano trzy kolory, odpowiednio czerwony, zielony i niebieski.



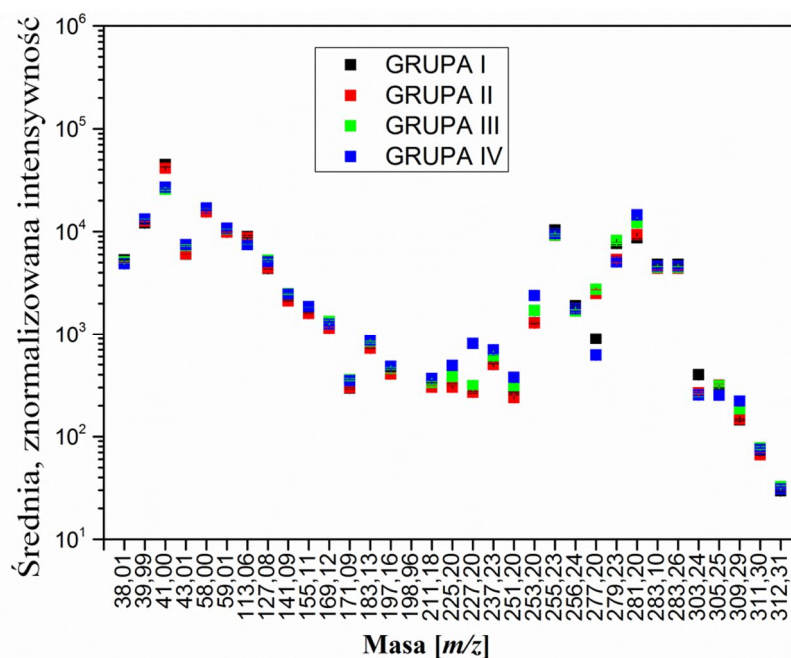
Rys. 15. Obraz złożenia trzech map 2D dla charakterystycznego jonu fosfatydylocholiny (czerwony kolor) i jonów cholesterolu (zielony i niebieski kolor). Obrazy pochodzą z powierzchni $70 \times 70 \mu\text{m}^2$ próbki mięśni piersiowych brojlerów z IV grupy. Na obrazie zaznaczono obszary tłuszczu śródmięśniowego i włókien mięśniowych.

Uzyskany obraz pokazuje, że wysoki sygnał jonów cholesterolu pochodzi z obszaru tłuszczu śródmięśniowego, zaś w obszarze włókien mięśniowych jest on zdecydowanie słabszy. Widoczne jest również, że fosfatydylocholina zlokalizowana jest głównie w obszarach włókien mięśniowych. Złożenie map 2D może być wykonane dla dowolnie wybranych, interesujących nas jonów. W dalszej części pracy przedstawiono szczegółową analizę obejmującą każdą kategorię lipidową z osobna.

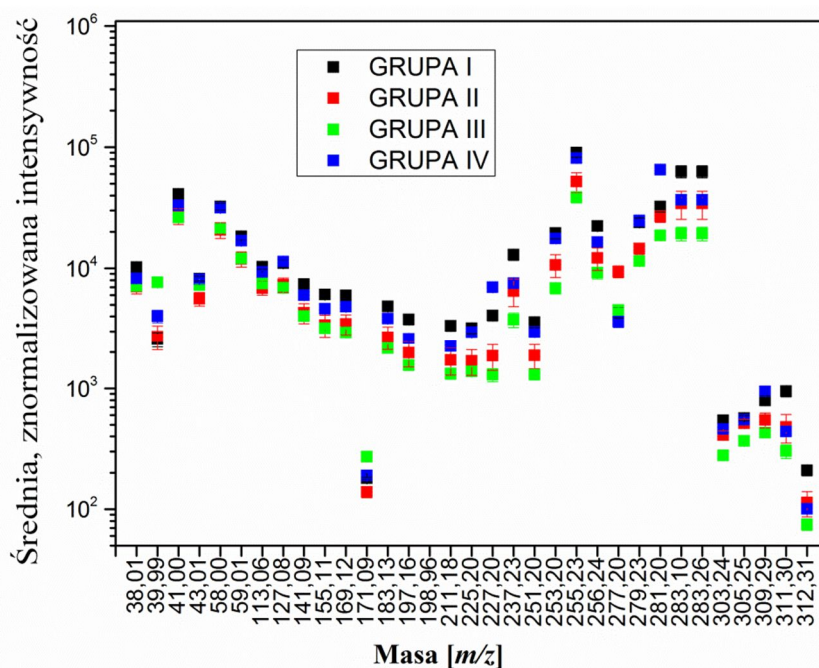
4.1. Kwasy tłuszczowe

Przedmiotem rozważań w tym podrozdziale jest grupa lipidowa obejmująca kwasy tłuszczowe. Wiele doniesień literaturowych wykazuje wpływ żywienia brojlerów na skład kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej [125, 240]. W większości prac, autorzy podkreślają potrzebę poprawy stosunku nienasyconych kwasów tłuszczowych ω -6/ ω -3 w spożywanym pożywieniu. Dieta brojlerów, w głównej mierze, opiera się na spożyciu zbóż bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny ω -6, stąd istotne jest dostarczenie do paszy takich składników, które zwiększą spożycie kwasów z rodziny ω -3. Zwiększenie udziału wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ω -3 w mięsie może jednak prowadzić do szeregu niekorzystnych zmian jakości sensorycznej i obniżenia trwałości otrzymanego wyrobu. Z tego powodu, istotne znaczenie ma określenie optymalnego poziomu wzbogacenia produktu mięsnego. Najczęstszym sposobem zwiększenia zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ω -3 w mięsie, jest stosowanie w paszach dla zwierząt hodowlanych różnych dodatków, np. siemienia lnianego, oleju lnianego, oleju rybnego, jak również preparatów z alg morskich. Dotychczas przedstawiono wiele interesujących wyników opisujących to zagadnienie [125].

Poglądowe wykresy przedstawiające wartości uśrednionych, znormalizowanych intensywności dla wszystkich zidentyfikowanych, charakterystycznych pików dla kwasów tłuszczowych w polaryzacji ujemnej, w przypadku obszarów włókien mięśniowych oraz tłuszczu śródmięśniowego, przedstawiono na **Rys. 16** i **Rys. 17**.



Rys. 16. Poglądowe zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików kwasów tłuszczowych w polaryzacji ujemnej dla włókien mięśniowych.



Rys. 17. Poglądowe zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików kwasów tłuszczowych w polaryzacji ujemnej dla tłuszczu śródmięśniowego.

Masy charakterystycznych jonów wymienionych na powyższych rysunkach zostały zebrane na podstawie licznych danych literaturowych oraz biblioteki zawartej w programie SurfaceLab. Charakterystyka tych jonów, a więc wzory sumaryczne, nazwy oraz przykłady struktur tkankowych, w których jony te występują, znajdują się w załączonym aneksie.

Zależności zilustrowane na powyższych wykresach mają przede wszystkim na celu zaprezentowanie wszystkich zidentyfikowanych jonów charakterystycznych dla kwasów tłuszczowych. Bardziej szczegółowa analiza występujących zmian międzygrupowych dotyczyć będzie wybranych jonów charakterystycznych, zazwyczaj jonów macierzystych lub innych jonów o dużych masach (zakres m/z 200 – 800), charakterystycznych dla danych związków lipidowych. Z informacji zawartych w części teoretycznej, wynika iż bombardowanie wiązką jonów pierwotnych powoduje powstanie zjonizowanych fragmentów cząsteczek oraz jonizację całych, macierzystych cząsteczek próbki. W efekcie, na widmie masowym otrzymujemy piki od charakterystycznych fragmentów lipidów zawartych w tkance oraz od cząsteczek macierzystych. Ze względu na charakter zjawiska, dla wielu różnych lipidów lub innych cząsteczek biologicznych obserwuje się takie same zjonizowane fragmenty, szczególnie w zakresie niskich mas. Takie zjawiska mogą prowadzić do błędnych wniosków w analizie porównawczej, z tego powodu jony z zakresu niskich mas pominięto w szczegółowej analizie.

Na **Rys. 16** zaprezentowano wartości średnich intensywności dla 33 charakterystycznych mas ujemnych jonów pochodzących od kwasów tłuszczowych w obszarze włókien mięśniowych. Można dostrzec, iż dla mas

większych od 200 amu nie ma jednoznacznej tendencji zmian, zaś dla mas mniejszych od 200 amu wartości intensywności dla czterech występujących grup plasują się w podobnej tendencji. Zdecydowanie większe różnice można dostrzec na **Rys. 17**, na którym zaprezentowano wyniki dla tłuszczu śródmięśniowego. Dla większości mas w przypadku grupy III występują mniejsze wartości średnich intensywności, natomiast większe wartości zaobserwowano w grupach I, II lub IV.

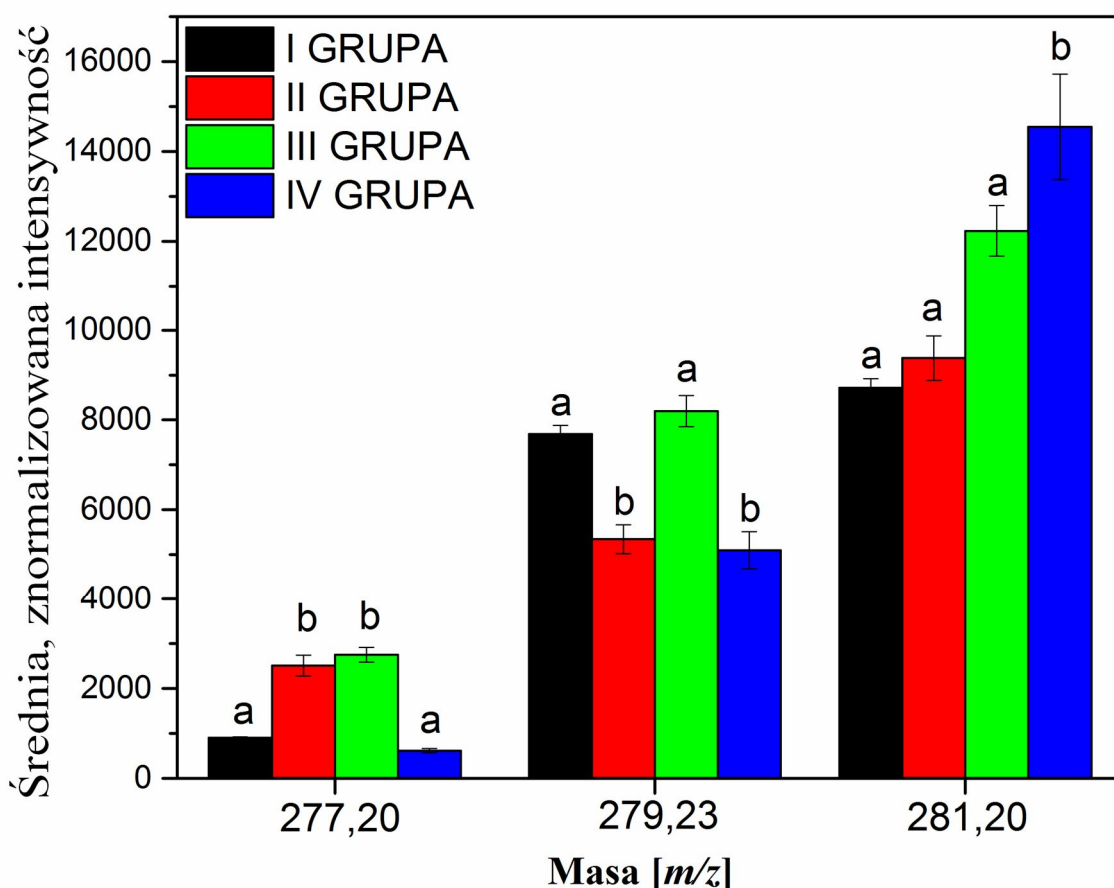
Aby szczegółowo zbadać występujące tendencje oraz sprawdzić czy uzyskane, międzygrupowe różnice są istotne ze statystycznego punktu widzenia, poniżej przedstawiono dokładną analizę dla wybranych kwasów tłuszczowych. Jonem macierzystym dla kwasu oleinowego jest jon o masie m/z 281,20 ($[\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2]^-$), dla kwasu linolowego jon o m/z 279,23 ($[\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_2]^-$) oraz dla kwasu linolenowego jon o m/z 277,20 ($[\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{O}_2]^-$). Wyniki analizy ANOVA oraz testu Tukey'a odnoszących się do wyżej wymienionych jonów molekularnych charakteryzujących te kwasy tłuszczowe znajdują się w **Tab. 3**.

Tab. 3. Analiza wariancji średnich, znormalizowanych intensywności dla kwasów linolenowego, linolowego oraz oleinowego w polaryzacji ujemnej. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_1 \geq 2,65$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Kwas</i>	<i>Masa jonu molekularnego [m/z]</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>	<i>Grupa</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_2</i>
<i>WŁÓKNO MIĘŚNIOWE (A)</i>				
Linolenowy	277,20	66,69	I GRUPA	725,92
			II GRUPA	94,32
Linolowy	279,23	22,12	III GRUPA	109,47
Oleinowy	281,20	10,74	IV GRUPA	74,05
<i>OBSZAR TŁUSZCZU ŚRÓDMIĘŚNIOWEGO (B)</i>				
Linolenowy	277,20	27,10	I GRUPA	42,63
			II GRUPA	23,82
Linolowy	279,23	7,42	III GRUPA	62,15
Oleinowy	281,20	15,46	IV GRUPA	50,53

W przypadku włókien mięśniowych dla wszystkich trzech jonów macierzystych, analiza wariancji ANOVA wskazuje na istotnie statystycznie różnice pomiędzy grupami żywieniowymi. Statystyka F_1 jest większa od wartości krytycznej, największa wartość statystyki F_1 przypada dla kwasu linolenowego, a najmniejsza dla kwasu oleinowego. Podobnie w przypadku tłuszczu śródmięśniowego, wartości statystyki F_1 analizowanych jonów molekularnych wskazują na istotne różnice pomiędzy grupami żywieniowymi zwierząt. W tym przypadku największa wartość przypada dla kwasu linolenowego, a najmniejsza dla kwasu linolowego.

W celu przejrzystego zobrazowania różnic pomiędzy grupami, na **Rys. 18** zaprezentowano histogram wartości uśrednionych i znormalizowanych intensywności dla trzech wybranych jonów molekularnych w przypadku włókien mięśniowych.



Rys. 18. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, macierzystych jonów: kwasu linolenowego (m/z 277,20), linolowego (m/z 279,23), oleinowego (m/z 281,20) w obszarach włókien mięśniowych. Indeksy a, b przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych kwasów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

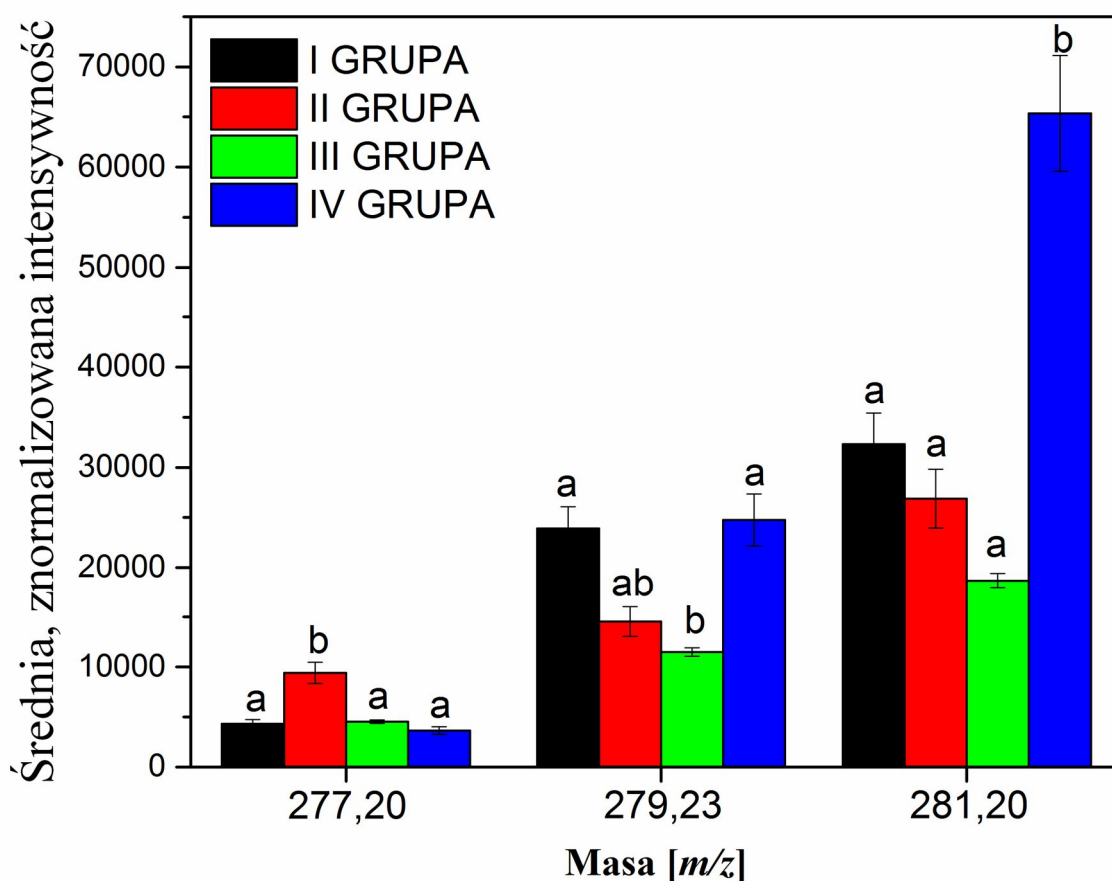
Przeprowadzona analiza wykazała, że stosowana dieta miała istotny wpływ na poziom intensywności dla ujemnie naładowanych jonów macierzystych kwasu linolenowego (m/z 277,20), linolowego (m/z 279,23) oraz oleinowego (m/z 281,20) analizowanych we włóknach mięśniowych. I tak, dla kwasu linolenowego (m/z 277,20), istotnie większe intensywności odnotowano w grupie II oraz grupie III w porównaniu do grupy I oraz IV. Tak wysokie intensywności tego jonu w grupach II i III związane są najprawdopodobniej z zastosowaniem oleju lnianego w żywieniu tych grup zwierząt, gdyż jak wskazują wcześniejsze badania [241] olej lniany jest bogatym źródłem kwasu linolenowego, co zdecydowanie potwierdzają uzyskane w pracy wyniki.

W przypadku kwasu linolowego (m/z 279,23) istotnie wyższe wartości intensywności tego jonu stwierdzono w grupie I oraz III w porównaniu do grup II i IV, pomiędzy którymi nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. Zwierzęta w grupie I były karmione paszą z dodatkiem oleju sojowego, który jest bogatym źródłem kwasu linolowego (wysoka zawartość ω -6). W grupie III zwierzęta otrzymywały pokarm, w którym zastosowano oba tłuszcze. Olej lniany w swoim składzie zawiera również kwas linolowy, jednak w zdecydowanie mniejszej ilości

w stosunku do oleju sojowego. Fakt ten może tłumaczyć obserwowane w niniejszej pracy istotnie niższe wartości intensywności jonu kwasu linolowego w grupie II w stosunku do grupy I oraz III [242]. Wyniki sugerują, iż olej sojowy zwiększa ilość kwasu linolowego w tkance mięśniowej, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami [243].

Pewne wspólne cechy zaistniałych różnic międzygrupowych można zauważyć również w przypadku jonu molekularnego kwasu oleinowego (m/z 281,20). Kwas ten należy do rodziny kwasów ω -9, a znajduje się w większości olejów roślinnych oraz w znacznej zawartości w łożu wołowym [244]. Najwyższe wartości stwierdzono w grupie IV, a więc w tej w której nie zastosowano tłuszczu pochodzenia roślinnego, w porównaniu do pozostałych grup żywieniowych, pomiędzy którymi różnice były nieistotne statystycznie. Można jedynie wskazać na tendencję do wzrostu intensywności tego jonu począwszy od grupy I przez II do III.

Analogicznie, jak dla włókien mięśniowych, na **Rys. 19** zaprezentowano zestawienia odnoszące się do tłuszczu śródmięśniowego dla trzech kwasów tłuszczowych: linolenowego (m/z 277,20), linolowego (m/z 279,23), oleinowego (m/z 281,20).



Rys. 19. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, macierzystych jonów: kwasu linolenowego (m/z 277,20), linolowego (m/z 279,23), oleinowego (m/z 281,20) w obszarach tłuszczu śródmięśniowego. Indeksy a, b przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych kwasów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Pierwsza masa, dla której wartości intensywności zostały zilustrowane na **Rys. 19**, odpowiada macierzystemu jonowi kwasu linolenowego (m/z 277,20). Zgodnie z oczekiwaniami największa wartość intensywności występuje w grupie II, w której zastosowano w suplementacji olej lniany, niezwykle bogaty w kwas linolenowy z rodziny ω -3. W pozostałych grupach nie odnotowano istotnych różnic w wartościach intensywności. Tak wysoka intensywność jonu kwasu linolenowego wykazana w grupie II w przypadku tłuszczu śródmięśniowego oraz w grupie II i III w przypadku włókien mięśniowych może być korzystna z punktu widzenia właściwej diety człowieka, gdyż kwas linolenowy jest prekursorem takich kwasów jak: eikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA), czyli kwasów niezbędnych do prawidłowego rozwoju i zdrowia człowieka. Kwasy te są szczególnie istotne w zapobieganiu miażdżycy [245].

W przypadku kwasu linolowego, którego jon macierzysty ma masę m/z 279,23 ($[C_{18}H_{31}O_2]^-$), test Tukey'a wskazuje na istotnie niższe wartości intensywności tego jonu w grupie III w porównaniu do grupy I oraz IV, w obrębie których różnice były nieistotne statystycznie. Z kolei, wartość intensywności jonu kwasu linolowego w grupie II nie różniła się istotnie od wartości intensywności obserwowanych dla pozostałych grup żywieniowych.

Analogicznie jak dla włókien mięśniowych, w przypadku tłuszczu śródmięśniowego istotnie większa wartość intensywności dla jonu o masie m/z 281,20 ($[C_{18}H_{33}O_2]^-$), czyli jonu macierzystego kwasu oleinowego, przypada w grupie IV, a więc u zwierząt karmionych łożem wołowym, w stosunku do pozostałych grup żywieniowych, pomiędzy którymi różnice były nieistotne statystycznie. Jednakże warto zaznaczyć, że w przeciwieństwie do włókien mięśniowych, w tłuszczu śródmięśniowym obserwowano tendencję do spadku intensywności tego jonu od grupy I przez II do III.

Uzyskane dla tłuszczu śródmięśniowego wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje Migdał i in. [246], w których wykazano, że skład tłuszczu zwierząt gospodarskich, w tym drobiu jest w dużym stopniu odzwierciedleniem składu tłuszczu obecnego w diecie zwierząt. Należy jednak pamiętać, że modyfikowanie profilu kwasów tłuszczowych mięsa zwierząt rzeźnych niesie za sobą także pewne negatywne konsekwencje. Zbyt duża ilość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w tłuszczu śródmięśniowym wpływa na proces jełczenia oksydacyjnego, co skutkuje zmianami w barwie i teksturze mięsa, a także niekorzystnie wpływa na cechy sensoryczne, w tym głównie smak i zapach mięsa [247, 248].

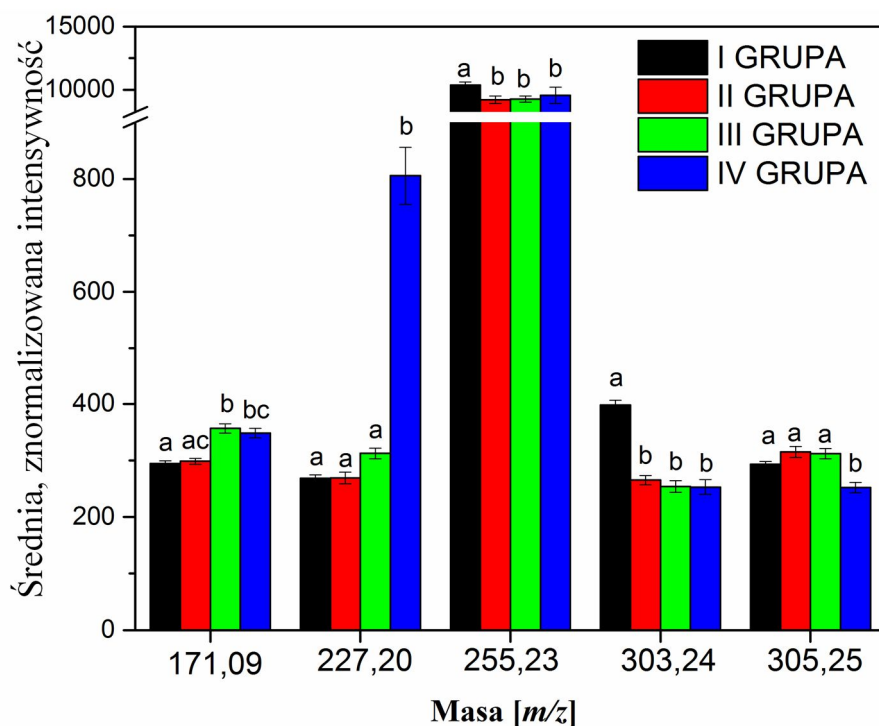
Dotychczas przedstawiono wyniki dla trzech wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, dla których istnieją literaturowe przesłanki dotyczące znaczących różnic międzygrupowych. Nasuwa się pytanie jak kształtują się między grupowe zmiany w przypadku innych kwasów tłuszczowych. W **Tab. 4** zestawiono dane dotyczące pięciu nasyconych kwasów tłuszczowych oraz dwóch nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny ω -6. Umieszczone w tabeli dane dotyczą wyników uzyskanych dla ujemnych jonów pochodzących z włókien mięśniowych.

Tab. 4. Analiza wariancji dla wybranych kwasów tłuszczowych w polaryzacji ujemnej dla obszarów włókien mięśniowych. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_1 \geq 2,65$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Kwas</i>		<i>Masa jonu molekularnego [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Nasycone	Kaprynowy	171,09	$[C_{10}H_{19}O_2]^-$	6,75
	Mirystynowy	227,20	$[C_{14}H_{27}O_2]^-$	75,23
	Palmitynowy	255,23	$[C_{16}H_{31}O_2]^-$	3,83
	Stearynowy	283,26	$[C_{18}H_{35}O_2]^-$	2,33
	Arachidowy	311,30	$[C_{20}H_{39}O_2]^-$	1,38
Nienasycone	Arachidonowy	303,24	$[C_{20}H_{31}O_2]^-$	58,81
	Dihomo- γ -linolenowy (DGLA)	305,25	$[C_{20}H_{33}O_2]^-$	14,33

I tak, w przypadku dwóch kwasów, to jest kwasu stearynowego i arachidowego, statystyka F_1 w analizie ANOVA ma mniejszą wartość od wartości krytycznej na poziomie ufności $\alpha=0,05$, co świadczy o braku istotnego wpływu żywienia na wartości intensywności jonów molekularnych wspomnianych kwasów.

Na **Rys. 20** przedstawiono histogram zestawiający średnie wartości znormalizowanych intensywności dla ujemnych, charakterystycznych jonów wybranych trzech kwasów nasyconych oraz dwóch kwasów nienasyconych analizowanych we włóknach mięśniowych, w przypadku których wartości statystyki F_1 są większe od wartości krytycznej.



Rys. 20. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, charakterystycznych jonów wybranych kwasów tłuszczowych dla włókien mięśniowych. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych kwasów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Pierwszy z analizowanych kwasów nasyconych, kwas kaprynowy (m/z 171,09), jest 10-cio węglowym kwasem nasyconym występującym w naturalnych produktach żywnościowych. Kwas ten, o średniej długości łańcucha, bierze udział w dystrybucji lipoprotein HDL transportujących cholesterol z tkanek i narządów do wątroby [249]. Analizując wyniki dla wartości intensywności jonu molekularnego kwasu kaprynowego (m/z 171,09) stwierdzono, że istotnie wyższą wartością tej cechy charakteryzowała się grupa III w porównaniu do grupy I oraz II, gdzie dla obu tych grup różnice były nieistotne statystycznie. Z kolei, grupa IV cechowała się wyższą intensywnością w porównaniu do grupy I, przy równoczesnym braku istotnych różnic z grupą II oraz III.

W przypadku kwasu mirystynowego, o jonie macierzystym m/z 227,20, istotnie wyższe wartości intensywności odnotowano w grupie IV w porównaniu do grupy I, II oraz III, pomiędzy którymi nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. Kwas mirystynowy wstępuje w większości tłuszczu i olejów pochodzenia zwierzęcego oraz roślinnego [33]. Jest on także jednym z najczęściej występujących nasyconych kwasów tłuszczowych w diecie. Podobnie jak kwas palmitynowy uważany jest za czynnik wzrostu poziomu „złego” cholesterolu. Bierze on udział w mechanizmie regulacji aktywności lipoprotein niskiej gęstości LDL i przyczynia się do kumulacji cholesterolu LDL w osoczu [250]. Stąd też, z wymienionych powyżej przyczyn, zalecane jest ograniczenie spożycia tego tłuszczu. Stwierdzona w niniejszej pracy ponad dwukrotnie wyższa intensywność jonu tego kwasu w grupie IV, czyli w grupie, w której zwierzęta były karmione standardową dietą bez dodatku oleju pochodzenia roślinnego natomiast z dodatkiem łożu wołowego wskazuje, że to właśnie ten składnik diety przyczynia się do wzrostu zawartości kwasu mirystynowego.

Do grupy tłuszczu, których zaleca się ograniczenie w spożywanej diecie należy również kwas palmitynowy (m/z 255,23). Występuje on w większości produktów spożywczych i analogicznie jak kwas mirystynowy wpływa na wzrost poziomu cholesterolu LDL [33]. Jednakże co istotne, w prezentowanej pracy w odróżnieniu od kwasu mirystynowego, istotnie wyższe wartości intensywności dla jonu molekularnego kwasu palmitynowego stwierdzono w grupie I suplementowanej olejem sojowym w stosunku do pozostały analizowanych grup żywieniowych.

Pozostałe dwa kwasy, dla których przeprowadzono analizę TOF SIMS należą do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. W szlaku metabolicznym lipidów kwas arachidonowy (AA), który obecny jest we wszystkich tkankach, jest produktem przemian z rodziny wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ω -6 [34]. W efekcie kolejnych przemian metabolizowany jest do eikozanoidów (prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów), tzw. hormonów tkankowych, które mogą pośredniczyć także w procesach niekorzystnych dla zdrowia [33]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, iż istotnie największa wartość intensywności dla jonu molekularnego kwasu AA (m/z 303,24) odnotowana w grupie I, jest prawdopodobnie wynikiem suplementacji olejem sojowym bogatym w kwas

linolowy z rodziny ω -6. W pozostałych grupach wartości intensywności są w granicach błędu statystycznego.

Ostatni, z przedstawionych na histogramie kwasów, to kwas dihomo- γ -linolenowy (DGLA, m/z 305,25) będący produktem elongacji kwasu linolowego (ω -6). W przeprowadzonej analizie wartość intensywności dla grupy IV była istotnie niższa w porównaniu do pozostałych trzech grup, pomiędzy którymi nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. Wynik ten potwierdza, iż w grupie, w której nie zastosowano suplementacji olejami roślinnymi, bogatymi w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, poziom kwasu należącego do rodziny ω -6 jest niższy od pozostałych grup żywieniowych.

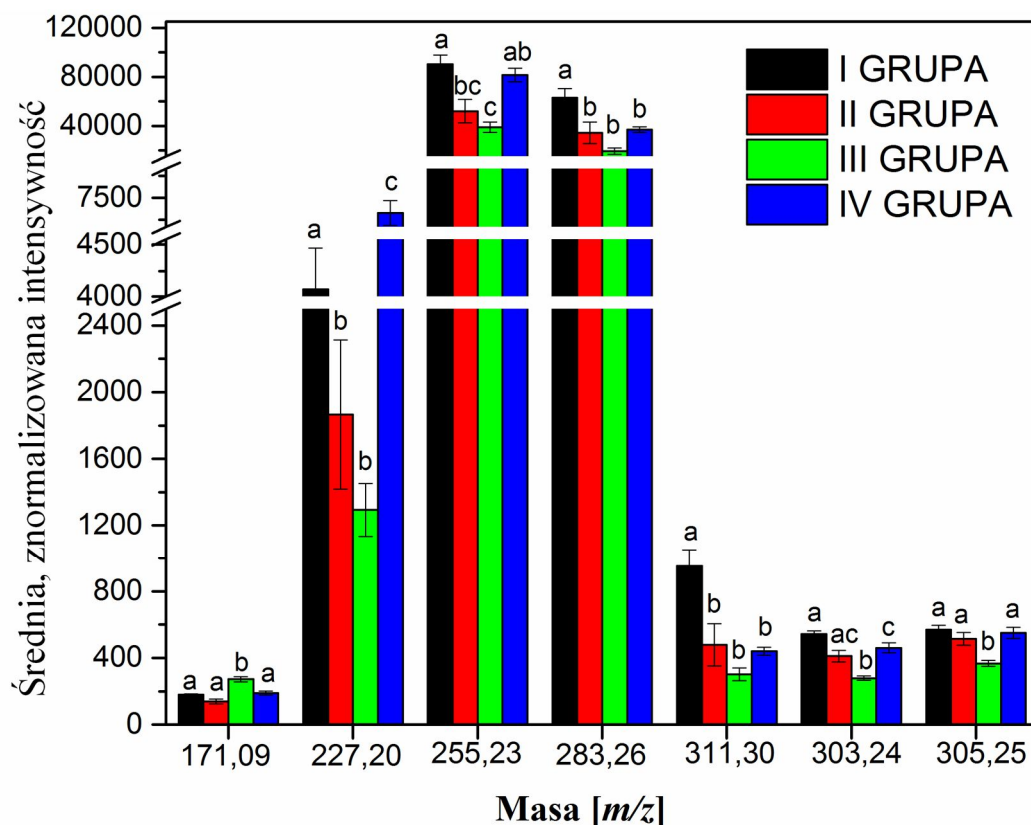
Przedstawione powyżej wyniki badań odnosiły się do analizy różnic we włóknach mięśniowych. W **Tab. 5** zawarto analogiczną analizę dotyczącą siedmiu wybranych kwasów tłuszczowych w przypadku obszarów zidentyfikowanych jako tłuszcz śródmięśniowy.

Tab. 5. Analiza wariancji dla wybranych kwasów tłuszczowych w polaryzacji ujemnej dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_{1 \geq 2,65}$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Kwas</i>		<i>Masa jonu molekularnego [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Nasycone	Kaprynowy	171,09	$[C_{10}H_{19}O_2]^-$	8,76
	Mirystynowy	227,20	$[C_{14}H_{27}O_2]^-$	23,07
	Palmitynowy	255,23	$[C_{16}H_{31}O_2]^-$	8,07
	Stearynowy	283,26	$[C_{18}H_{35}O_2]^-$	10,20
	Arachidowy	311,30	$[C_{20}H_{39}O_2]^-$	13,66
Nienasycone	Arachidonowy	303,24	$[C_{20}H_{31}O_2]^-$	15,30
	Dihomo- γ -linolenowy	305,25	$[C_{20}H_{33}O_2]^-$	7,54

Odmienne, niż było to w przypadku włókien mięśniowych, w przypadku tłuszczu śródmięśniowego dla wszystkich wyróżnionych kwasów analiza wariancji ANOVA wykazała różnice międzygrupowe.

Rys. 21 prezentuje histogram znormalizowanych średnich wartości intensywności dla wszystkich siedmiu kwasów tłuszczowych.



Rys. 21. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, charakterystycznych jonów wybranych kwasów tłuszczowych dla tłuszczu śródmięśniowego. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych kwasów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

W przypadku tłuszczu śródmięśniowego, kwas kaprynowy (m/z 171,09) przyjmuje istotnie wyższe wartości w grupie III w porównaniu do pozostałych trzech grup żywieniowych. Z kolei, tak samo jak w przypadku włókien mięśniowych, tak i dla tłuszczu śródmięśniowego, największa wartość intensywności dla kwasu mirystynowego (m/z 227,20) występuje w grupie IV, w której zwierzęta karmione były podstawową paszą bez dodatku olejów roślinnych, natomiast z dodatkiem łożu wołowego. Nieco odmiennie sytuacja wygląda dla pozostałych trzech grup, gdzie istotnie wyższa intensywność przypada w grupie I w stosunku do grupy II i III, między którymi różnice okazały się nieistotne statystycznie.

Jak wskazują uzyskane wyniki wartości intensywności dla kwasów palmitynowego (m/z 255,23) oraz stearynowego (m/z 283,26) są co najmniej rząd wielkości większe od pozostałych kwasów, przy czym dla kwasu palmitynowego (m/z 255,23), istotnie wyższe wartości intensywności odnotowano w grupie I w porównaniu do grupy II i III, gdzie różnice były nieistotne statystycznie. Istotnych statystycznie różnic nie stwierdzono także pomiędzy grupą I oraz IV, jednocześnie grupa IV cechowała się istotnie wyższą wartością intensywności w porównaniu do grupy III.

Kwas stearynowy jest jednym z tych kwasów tłuszczowych, który odgrywa istotną rolę w kształtowaniu kruchości i soczystości mięsa [246]. Badania Wood'a

i in. [251] wskazują, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy smakiem mięsa a zawartością w nim nasyconych kwasów tłuszczowych oraz ujemna korelacja w odniesieniu do kwasów nienasyconych. W prezentowanej pracy w przypadku pomiarów wykonanych dla kwasu stearynowego (m/z 283,26) i arachidowego (m/z 311,30) zaobserwowano analogiczne zależności. W obu przypadkach istotnie wyższe wartości intensywności stwierdzono w grupie I w porównaniu do pozostałych trzech grup żywieniowych.

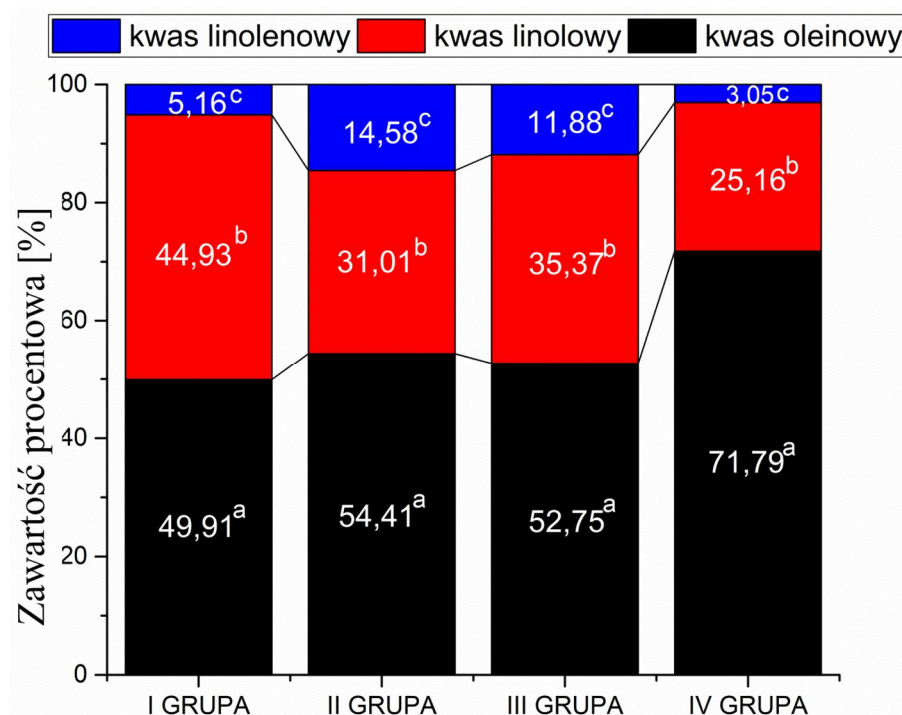
Przechodząc do analizy nienasyconych kwasów tłuszczowych, z których pierwszy - kwas arachidonowy (m/z 303,24), będący budulcem fosfolipidów błon komórkowych neuronów mózgu i fotoreceptorów siatkówki oka [252], cechował się istotnie wyższymi wartościami intensywności w grupie I w stosunku do grupy III i IV, przy równoczesnym braku istotnych różnic z grupą II. Grupa III natomiast, cechowała się istotnie najniższą intensywnością spośród wszystkich analizowanych grup żywieniowych. Tak jak miało to miejsce dla włókien mięśniowych, tak również w przypadku tłuszczu śródmięśniowego, wysoki poziom intensywności dla jonu molekularnego kwasu arachidonowego stwierdzony w grupie I jest prawdopodobnie efektem żywienia, gdyż właśnie ta grupa była karmiona olejem sojowym bogatym w kwas linolowy (ω -6) będący kwasem macierzystym dla kwasu arachidonowego.

Jak wynika z danych dla tłuszczu śródmięśniowego, nieco odmiennie kształtują się poziomy intensywności dla kwasu dihomo- γ -linolenowego (m/z 305,25) w stosunku do włókien mięśniowych. W tym przypadku, istotnie niższą wartość znormalizowanej intensywności stwierdzono w grupie III w porównaniu do pozostałych trzech, analizowanych grup żywieniowych.

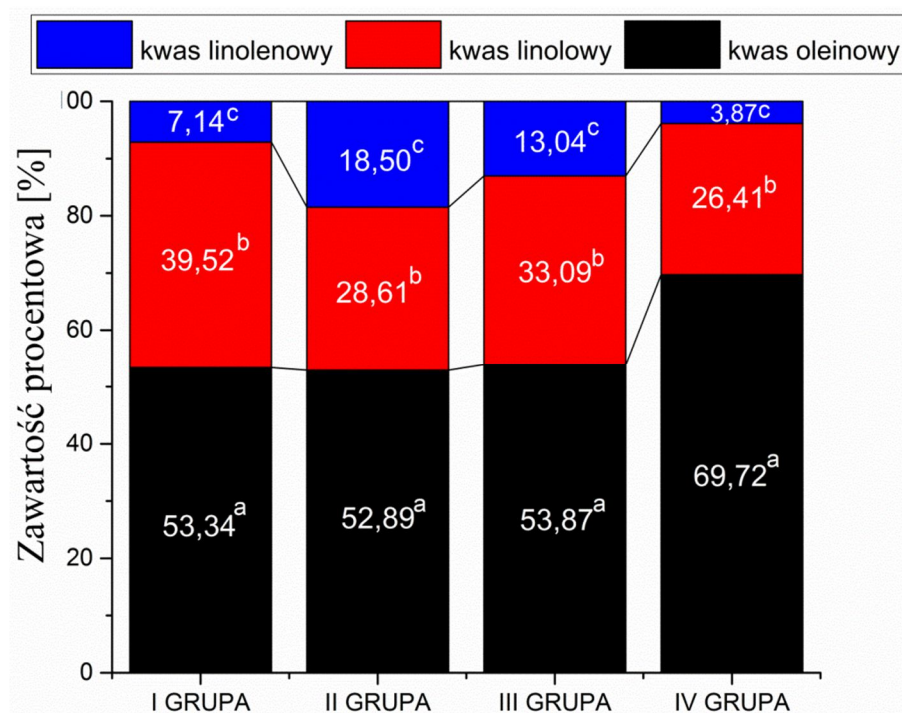
Wcześniejsze badania jednoznacznie wskazują, że mięso brojlerów jest jednym z tych produktów pochodzenia zwierzęcego, który oprócz dobrze przyswajalnego białka, witamin czy związków mineralnych, dostarcza człowiekowi znacznej ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, przy relatywnie niskiej ilości tłuszczów nasyconych [253, 254]. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe, a w szczególności kwasy szeregu ω -3 i ω -6 są fizjologicznie aktywnymi składnikami żywności nazywanymi witaminą F, ponieważ muszą być dostarczane człowiekowi z pożywienia [255]. Najważniejsze z nich to kwas α -linolenowy (ω -3) i kwas linolowy (ω -6). Spośród wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, kwasy tłuszczowe ω -3 są szczególnie istotne, ponieważ obniżają ryzyko wystąpienia niektórych chorób sercowo-naczyniowych, a także pewnych typów raka i alergii [256-260].

W prezentowanej pracy, w **Tab. 3** oraz na **Rys. 22** i **Rys. 23**, przedstawiono wyniki dotyczące udziału procentowego trzech istotnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w obrębie poszczególnych grup żywieniowych, analizowanych odpowiednio na obszarze włókien mięśniowych oraz tłuszczu śródmięśniowego. Porównanie udziału procentowego kwasów α -linolenowego, linolowego oraz oleinowego było możliwe ze względu na zbliżone masy

rejestrowanych jonów oraz niezmienny układ pomiarowy, co może świadczyć o zbliżonym współczynniku jonizacji dla tych trzech cząsteczek [175].



Rys. 22. Procentowy udział wybranych, trzech kwasów tłuszczowych w obrębie danej grupy żywieniowej wyznaczony dla włókien mięśniowych. Indeksy a, b, c przypisane średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy kwasami tłuszczowymi, w obrębie poszczególnych grup) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.



Rys. 23. Procentowy udział wybranych, trzech kwasów tłuszczowych w obrębie danej grupy żywieniowej, dane dotyczą tłuszczu śródmięśniowego. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy kwasami tłuszczowymi, w obrębie poszczególnych grup) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

I tak, przeprowadzona analiza wykazała, że we wszystkich grupach żywieniowych, zarówno we włóknach mięśniowych jak i w tłuszczu śródmięśniowym, istotnie największy udział w kompozycji trzech wielonienasyconych kwasów tłuszczowych stanowił kwas oleinowy, a istotnie najmniejszy kwas α -linolenowy. Z kolei, udział procentowy kwasu linolowego kształtował się na pośrednim poziomie.

Liczne badania wskazują, że poziom wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ma ogromny wpływ na ludzkie zdrowie, przy czym ważny jest nie tylko udział procentowy kwasów tłuszczowych w diecie, ale przede wszystkim proporcje kwasów szeregu ω -6 do ω -3. Kolanowski i Świderski [261] oraz Marciniak-Łukasiak i Krygier [262] wykazali, że wielonienasycone kwasy tłuszczowe szeregu ω -6 (linolowy, arachidonowy) i ω -3 (linolenowy, dokozaheksaenowy, eikozapentaenowy) w diecie człowieka powinny stanowić 1/3 w dziennym spożyciu wszystkich kwasów tłuszczowych. Z kolei Gomez i in. [263], a także zalecenia British Nutrition Foundation [264] wskazują, że optymalny stosunek kwasów ω -6 do ω -3 w diecie człowieka powinien wynosić 4:1 lub mniej, oraz nie powinien być on wyższy niż 10:1. Wysoki stosunek kwasów ω -6 do ω -3 w diecie człowieka jest niepożądany z uwagi na fakt, że rodzina kwasów ω -6 w drodze dalszych przemian jest metabolizowana do kwasu arachidonowego (AA), a ten z kolei do eikozanoidów – prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów określanych mianem hormonów tkankowych, które pośredniczą w wielu procesach niekorzystnych dla zdrowia. W trakcie przemian metabolicznych kwasy linolowy i α -linolenowy konkurują do tych samych enzymów desaturaz i elongaz oraz wzajemnie wpływają na poziom metabolitów w tkankach, dlatego tak istotny jest stosunek kwasów ω -6 do ω -3 w diecie. de Almeida [254] oraz Radu-Rusu i in. [265] analizując stosunek kwasów ω -6 do ω -3 w mięsie brojlerów wykazali, że waha się on średnio od ok. 7:1 do 12,5:1, przy czym najkorzystniejszą proporcją cechują się mięśnie piersiowe – ok. 3,7:1 [265]. W prezentowanej pracy również określono stosunek kwasów ω -6 do ω -3, przy czym możliwe było określenie tego stosunku tylko dla macierzystych kwasów z tych dwóch rodzin, a mianowicie dla kwasu linolowego i α -linolenowego. Przyczyną był brak widocznych na widmie pików charakterystycznych dla innych kwasów należących do rodziny ω -3. I tak, w przypadku włókien mięśniowych stosunek zawartości kwasu linolowego (ω -6) do kwasu α -linolenowego (ω -3) dla grupy I wyniósł odpowiednio 8,71:1, dla grupy II 2,13:1, dla grupy III 2,9:1, a dla grupy IV 8,25:1. Z kolei, dla obszaru tłuszczu śródmięśniowego stosunek kwasu linolowego do kwasu α -linolenowego oszacowano na poziomie 5,54:1 w przypadku grupy I, 1,55:1 w grupie II, 2,57:1 w grupie III oraz 6,82:1 w grupie IV. Z przeprowadzonej analizy wynika, że zarówno we włóknach mięśniowych jak i w tłuszczu śródmięśniowym najkorzystniejsza proporcja kwasów szeregu ω -6 do ω -3 występuje w grupie III, w której zastosowano w diecie zwierząt mieszaninę olejów sojowego i lnianego oraz w grupie II, gdzie zwierzęta suplementowano olejem lnianym, natomiast najmniej korzystną proporcję oszacowano dla grupy I suplementowanej olejem

sojowym, głównym źródłem kwasów ω -6 i IV żywionej dodatkiem oleju wołowego. Pieszka i Janik [266] wykazali, że mięso zawierające więcej kwasów tłuszczowych z rodziny ω -6 jest smaczniejsze w porównaniu z mięsem zawierającym więcej kwasów z rodziny ω -3.

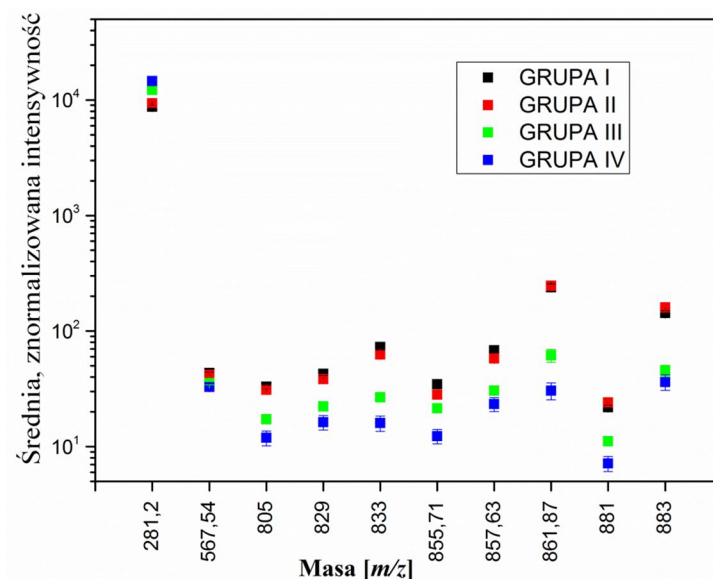
Z drugiej strony, nadmierna konsumpcja kwasów ω -6 (linolowy, arachidonowy) zarówno przez ludzi, jak i zwierzęta zaburza metabolizm kwasów ω -3 (linolenowy, dokozaheksaenowy, eikozapentaenowy), co prowadzi do zaburzeń regulacji gospodarki lipidowej i przeszkadza w fizjologicznej równowadze związków, które są syntetyzowane z tych kwasów [36]. Taki stan rzeczy może odpowiadać lub przynajmniej przyczyniać się do rozwoju przewlekłych chorób spowodowanych wzrostem odpowiedzi zapalnej organizmu, a także może zwiększać ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia nawet o 70%, [259, 267].

Zaobserwowane w niniejszej pracy różnice w intensywności jonów poszczególnych kwasów tłuszczowych pomiędzy grupami żywieniowymi zwierząt, potwierdzają wyniki wcześniejszych badań [268, 269], które wykazały, że przy użyciu czynnika żywieniowego możliwe jest manipulowanie składem kwasów tłuszczowych w mięsie brojlerów, co może pozwolić na uzyskanie mięsa o cechach „żywności funkcjonalnej” dostarczającego dużej ilości wielonienasyconych kwasów ω -6 i ω -3 w proporcjach zalecanych dla zdrowia człowieka.

Ponadto, przedstawione wyniki badań dla włókien mięśniowych i tłuszczu śródmięśniowego pozwalają stwierdzić prawidłową tendencję dla analizowanych kwasów tłuszczowych oraz skłaniają do przesłanek, iż technika TOF-SIMS umożliwia otrzymanie wartościowych informacji o charakterze jakościowym.

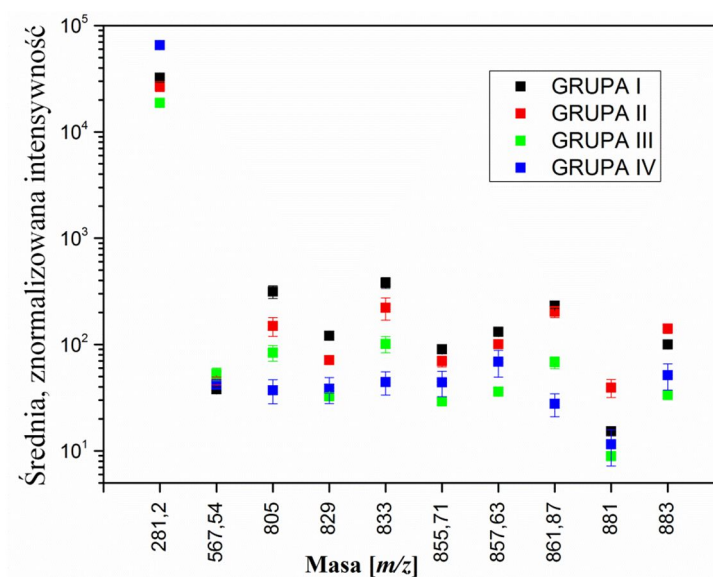
4.2. Glicerolipidy

Drugą analizowaną grupą lipidową są glicerolipidy. Jak zostało to opisane we wstępie teoretycznym, glicerolipidy stanowią ważną grupę uczestniczącą w strukturalnej budowie błon biologicznych i są głównymi składnikami tłuszczów zapasowych, acylogliceroli. Ponadto, lipidy należące do tej grupy związków oraz ich pochodne są powszechnie wykorzystywane jako biomarkery w mikrobiologii i innych dziedzinach nauki [203, 220, 270]. **Rys. 24, Rys. 25**, analogicznie jak w przypadku kwasów tłuszczowych, ilustrują wartości znormalizowanych intensywności dla wszystkich charakterystycznych pików w przypadku tej grupy lipidowej w polaryzacji ujemnej.



Rys. 24. Poglądowe zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików glicerolipidów w polaryzacji ujemnej dla włókien mięśniowych.

Przedstawione wyniki dotyczą obszarów włókien mięśniowych dla 10 wybranych charakterystycznych jonów glicerolipidów. Można zauważyć, że dla najmniejszej masy różnice między intensywnościami znacznie odbiegają od różnic dla pozostałych mas. Może to wynikać z faktu, iż masa m/z 281,2, jest charakterystyczną masą również dla innych lipidów, chociażby dla kwasu oleinowego. Z tego powodu, ta masa nie jest uwzględniana w dalszej analizie. Dla pozostałych mas widoczna jest taka sama tendencja wskazująca, iż w grupie IV wartości intensywności są najmniejsze, natomiast największe wartości intensywności obserwowano dla grup I oraz II.



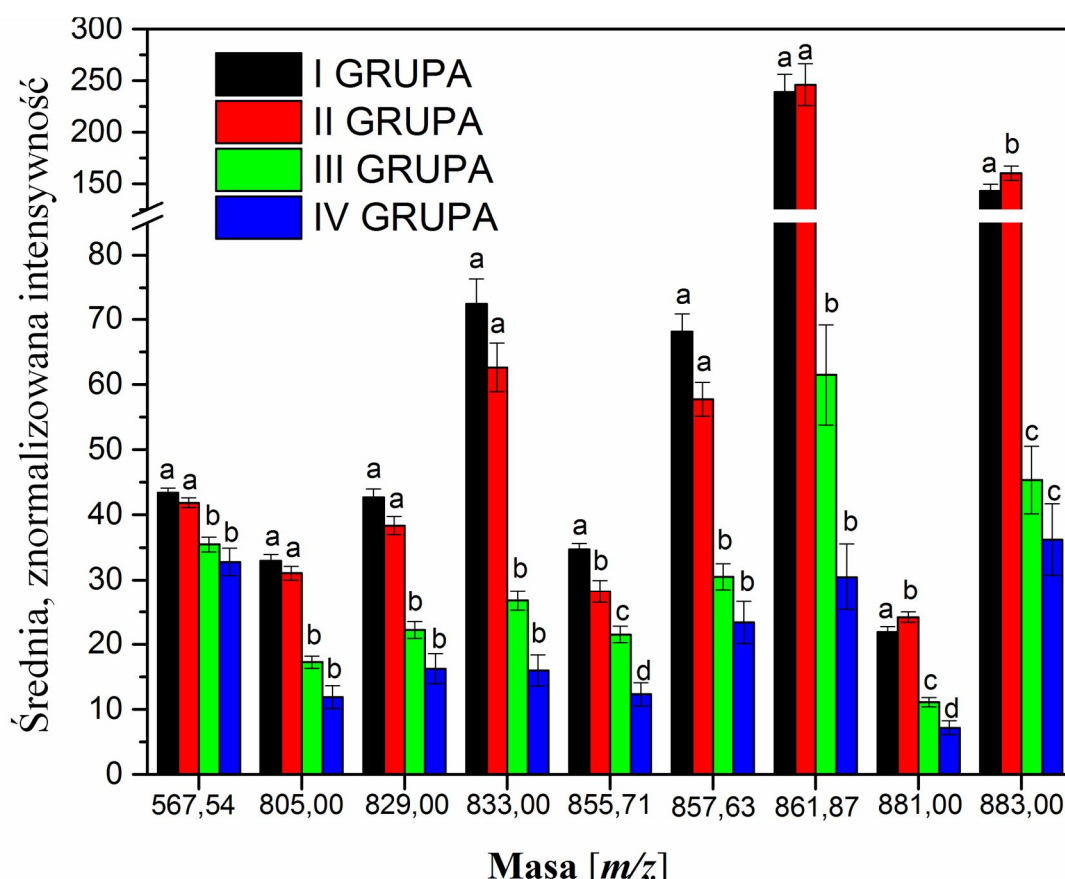
Rys. 25. Poglądowe zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików glicerolipidów w polaryzacji ujemnej dla tłuszczu śródmięśniowego.

Dane przedstawione na **Rys. 25** odnoszą się do wartości intensywności zmierzonych na obszarach zidentyfikowanych jako tłuszcze śródmięśniowy. Podobnie jak dla włókien mięśniowych, w analizie pominięto najmniejszą masę, skupiono się na 9 pozostałych charakterystycznych jonach. Również w tym przypadku można dostrzec pewne zróżnicowanie międzygrupowe dla wyróżnionych mas. Za wyjątkiem m/z 567,54, widoczne jest, iż największe intensywności występują dla grup I oraz II, natomiast mniejsze wartości przyporządkowane są grupie III oraz IV. Szczegółową analizę statystyczną dotyczącą włókien mięśniowych zawarto w **Tab. 6**, natomiast wyniki dla tłuszczu śródmięśniowego przedstawiono w **Tab. 7**.

Tab. 6. Analiza wariancji dla wybranych glikolipidów w polaryzacji ujemnej dla włókien mięśniowych. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_{1 \geq 2,65}$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Kwas</i>	<i>Masa jonu molekularnego [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Digliceryd 32:0	567,54	$[C_{35}H_{67}O_5]^-$	16,05
TAG 48:0	805,00	$[C_{51}H_{97}O_6]^-$	62,14
TAG 50:2	829,00	$[C_{53}H_{97}O_6]^-$	49,03
TAG 50:0	833,00	$[C_{53}H_{101}O_6]^-$	59,51
TAG 52:3	855,71	$[C_{55}H_{99}O_6]^-$	40,85
TAG 52:2	857,63	$[C_{55}H_{101}O_6]^-$	49,30
TAG 52:0	861,87	$[C_{55}H_{105}O_6]^-$	47,91
TAG 54:4	881,00	$[C_{57}H_{101}O_6]^-$	42,24
TAG 54:3	883,00	$[C_{57}H_{99}O_6]^-$	87,79

Tabela przedstawia wyniki analizy wariancji ANOVA oraz testu Tukey'a dla 9 wybranych charakterystycznych jonów w polaryzacji ujemnej, zmierzonych dla włókien mięśniowych. Pośród wybranych jonów znajduje się jeden charakterystyczny jon dla diglicerydu 32:0, natomiast pozostałe masy to masy charakterystycznych jonów trójglicerydów (TAG) różniące się ilością atomów węgla oraz umiejscowieniem wiązania podwójnego w łańcuchu. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała znaczące statystycznie różnice międzygrupowe. Na **Rys. 26** zaprezentowano w postaci histogramów wyniki odnoszące się do włókien mięśniowych dla wszystkich jonów umieszczonych w **Tab. 6**.



Rys. 26. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności dla ujemnych, charakterystycznych jonów wybranych glicerolipidów dla włókien mięśniowych. Indeksy a, b, c, d przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych glicerolipidów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Analiza wykazała podobne różnice pomiędzy poszczególnymi grupami żywieniowymi dla diglicerydu 32:0 (m/z 67,54), TAG 48:0 (m/z 805,00), TAG 50:2 (m/z 829,00), TAG 50:0 (m/z 833,00), TAG 52:2 (m/z 857,63) oraz TAG 52:0 (m/z 861,87). Grupy I oraz II cechują się istotnie wyższymi wartościami średnich intensywności w porównaniu z grupami III oraz IV, między którymi różnice są nieistotne statystycznie. Z kolei, w przypadku TAG 52:3 (m/z 855,71) najwyższa wartość intensywności przypada w grupie I, następnie wartości istotnie maleją od grupy II, przez III do najmniejszej wartości dla grupy IV.

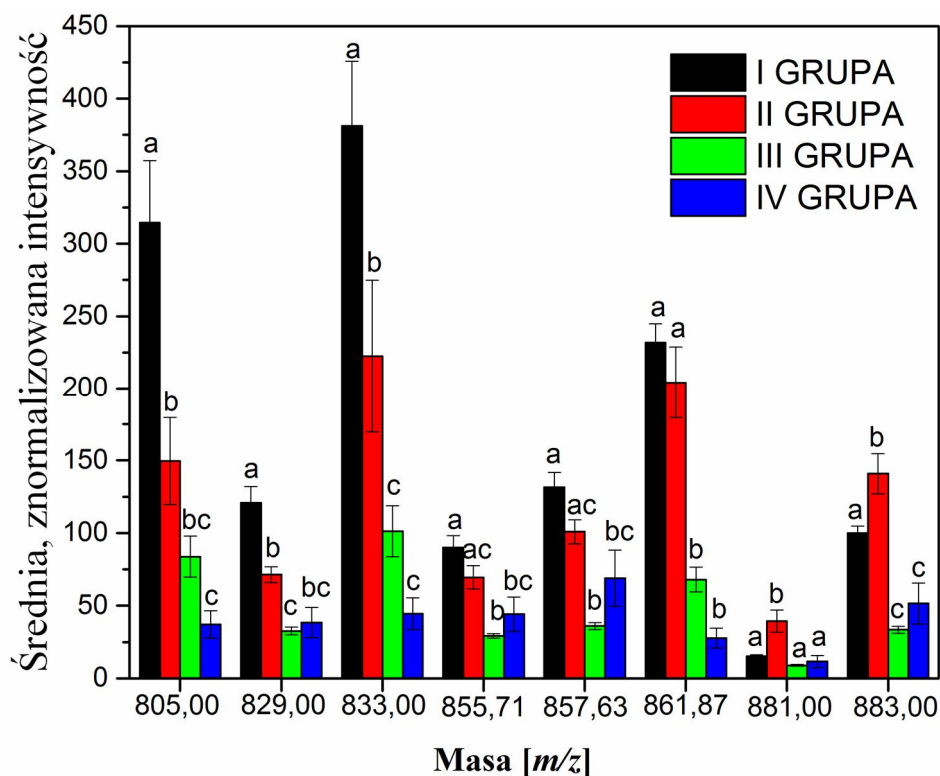
W przypadku dwóch mas charakterystycznych dla trójglicerydów TAG 52:0 (m/z 861,87) oraz TAG 54:3 (m/z 883,00), intensywności przyjmują około dwukrotnie większe wartości niż w przypadku pozostałych jonów. Porównując, z kolei, wartości intensywności TAG 54:4 (m/z 881,00) uwidoczniły się istotne różnice między wszystkimi czterema grupami, gdzie największa intensywność przypisana jest dla II grupy, następnie znacznie mniejsza w grupie suplementowanej olejem sojowym (I grupa) i kolejno istotnie mniejsza grupie III, a istotnie najmniejsza w grupie IV. Podobne wyniki otrzymano w przypadku TAG 54:3 (m/z 883,00), z tą różnicą, iż pomiędzy grupą III i IV nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic.

Wartości statystyki F_1 tłuszczu śródmięśniowego dotyczące wybranych, charakterystycznych jonów dla glicerolipidów mierzonych w polaryzacji ujemnej przedstawia **Tab. 7**.

Tab. 7. Analiza wariancji dla wybranych glicerolipidów w polaryzacji ujemnej dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_{1 \geq 2,65}$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Kwas</i>	<i>Masa jonu molekularnego [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Digliceryd 32:0	567,54	$[C_{35}H_{67}O_5]^-$	1,72
TAG 48:0	805,00	$[C_{51}H_{97}O_6]^-$	22,84
TAG 50:2	829,00	$[C_{53}H_{97}O_6]^-$	20,40
TAG 50:0	833,00	$[C_{53}H_{101}O_6]^-$	23,12
TAG 52:3	855,71	$[C_{55}H_{99}O_6]^-$	9,15
TAG 52:2	857,63	$[C_{55}H_{101}O_6]^-$	8,42
TAG 52:0	861,87	$[C_{55}H_{105}O_6]^-$	63,77
TAG 54:4	881,00	$[C_{57}H_{101}O_6]^-$	7,05
TAG 54:3	883,00	$[C_{57}H_{99}O_6]^-$	20,27

Z tabeli wynika, że tylko w przypadku diglicerydu 32:0 wartość statystyki F_1 nie klasyfikuje tej masy jako istotnej statystycznie ze względu na różnice międzygrupowe. Z tego względu, masę m/z 567,54 pominięto w zestawieniu kolumnowym umieszczonym na **Rys. 27**.



Rys. 27. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności dla ujemnych, charakterystycznych jonów wybranych glicerolipidów w przypadku tłuszczu śródmięśniowego. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych glicerolipidów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

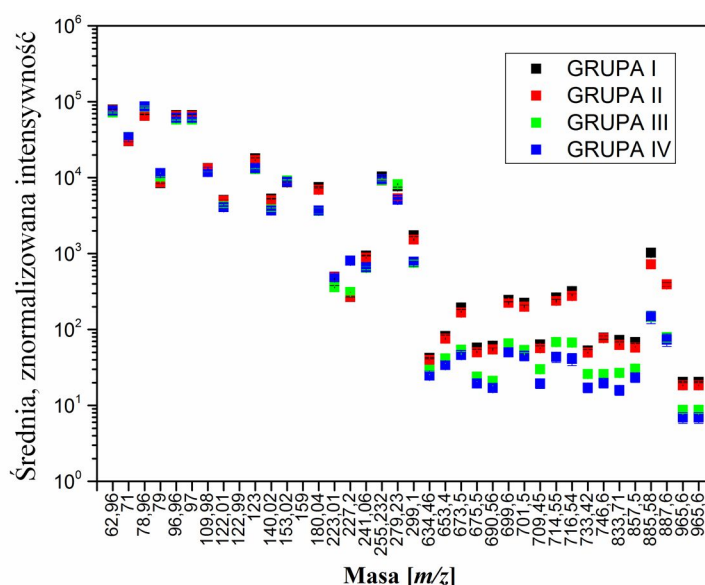
Odnosząc się do wyników zaprezentowanych na obu rysunkach, w przypadku dwóch charakterystycznych jonów, TAG 52:0 (m/z 861,87) oraz TAG 54:3 (m/z 883,00), stosunki wartości intensywności dla tłuszczu śródmięśniowego pokrywają się z proporcjami obliczonymi dla włókien mięśniowych. Natomiast, wartości intensywności dla poszczególnych grup są na zbliżonym poziomie. W przypadku TAG 48:0 (m/z 805,00), TAG 50:2 (m/z 829,00) oraz TAG 50:0 (m/z 833,00) wartości średnich intensywności w grupie I mają największe wartości w stosunku do pozostałych grup. Dla tych trzech jonów wartości intensywności istotnie maleją dla grupy II. Z kolei, grupa III i IV dla TAG 50:0 (m/z 833,00) prezentuje najniższe wartości intensywności. W odniesieniu do TAG 48:0 (m/z 805,00), grupa IV cechuje się istotnie niższymi wartościami intensywności w stosunku do grupy I oraz II, przy równocześnie braku istotnych statystycznie różnic z grupą III. Dla TAG 50:2 (m/z 829,00) wartości średnich intensywności między grupą III a IV oraz IV a II nie były istotne statystycznie w przeciwieństwie do grupy II oraz III, pomiędzy którymi istotnie niższe wartości intensywności odnotowano w grupie III.

Wyniki niniejszych badań wskazują również na analogiczne proporcje w wartościach intensywności dla poszczególnych grup żywieniowych w przypadku mas m/z 855,71 (TAG 52:3) oraz m/z 857,63 (TAG 52:2). I tak, grupę I oraz II charakteryzują znacząco wyższe wartości intensywności w porównaniu z grupą III, natomiast między grupą II oraz IV, jak również między grupą III i IV nie występują istotne różnice. Z kolei, jon trójglicerydu 54:4 (m/z 881,00) najwyższą intensywność uzyskuje w grupie II w porównaniu do grupy I, III i IV, między którymi nie odnotowano statystycznie istotnych różnic.

Przedstawione wyniki wskazują, że dla większości analizowanych jonów można zauważyć podobny trend, iż mniejsze wartości intensywności występują w grupie III oraz IV, natomiast wyższymi wartościami intensywności cechują się grupy I oraz II suplementowane odpowiednio olejem sojowym i lnianym. Można więc stwierdzić, że dodawanie do paszy jednego typu oleju pochodzenia roślinnego powoduje wzrost zawartości glicerolipidów, w szczególności trójglicerydów. Otrzymane wyniki są zgodne z wcześniejszymi danymi literaturowymi. Barteczko i in. [271] w pracy nad efektywnością żywienia brojlerów mieszankami z udziałem nasion różnych odmian lnu oleistego podkreślają, iż u brojlerów żywionych paszą wzbogaconą lnem obserwowano wyższy poziom trójglicerydów w stosunku do grupy kontrolnej przy jednoczesnym mniejszym poziomie cholesterolu całkowitego. Jak sugerują Barteczko i Kamiński [272] oraz Niemiec [273] zwiększona zawartość trójglicerydów w surowicy krwi ptaków żywionych mieszankami o dużej zawartości tłuszczu roślinnego może wynikać z ich zwiększonej syntezy, wywołanej wysoką podażą tłuszczu paszowego.

4.3. Glicerofosfolipidy

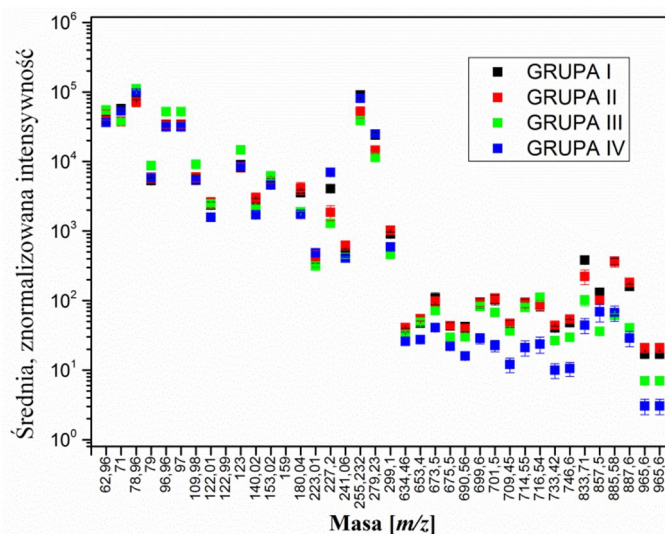
O różnorodności i wszechstronności funkcji glicerofosfolipidów wspomniano we wstępie teoretycznym. Przyczyną złożoności tej klasy biomolekuł jest ich amfifilowy charakter oraz występowanie różnego rodzaju grup głównych i łańcuchów kwasów tłuszczowych przyłączonych do glicerynowego szkieletu. O aktywności biologicznej tej grupy związków decyduje rodzaj kwasów tłuszczowych połączonych wiązaniami estrowymi z glicerolem, natomiast do grupy głównej w części polarnej, za pomocą fosforanu, może być przyłączona cholinowa, etanoloaminowa, serynowa, glicerynowa lub inozytolowa grupa funkcyjna. Z tego powodu do glicerofosfolipidów obecnych w błonach komórkowych zalicza się między innymi fosfatydylocholinę (znana również pod nazwą lecytyny lub PC), fosfatydyloetanoloaminę (PE), fosfatydyloinozytol (PI) oraz fosfatydyloserynę (PS) [22]. Udowodniono, iż fosfolipidy, obecne m. in. w żółtku jaj, wątrobie wieprzowej i drobiowej, owocach morza, czy produktach mlecznych, stanowią związki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu oraz pełnią istotną rolę w profilaktyce chorób cywilizacyjnych [274]. Na **Rys. 28**, **Rys. 29** zamieszczono zestawienia ilustrujące znormalizowane wartości intensywności wszystkich zebranych, charakterystycznych jonów dla glicerofosfolipidów w polaryzacji ujemnej, zmierzonych na obszarach włókien mięśniowych i tłuszczu śródmięśniowego.



Rys. 28. Poglądowe zestawienie średniej, znormalizowanej intensywności dla charakterystycznych pików glicerofosfolipidów w polaryzacji ujemnej dla włókien mięśniowych.

Rys. 28 prezentuje wartości znormalizowanych intensywności dla 38 wybranych mas, charakterystycznych, ujemnych jonów glicerofosfolipidów. Z rysunku wynika, że w zakresie mas od m/z 62,96 do m/z 299,1 nie da się określić żadnej tendencji, natomiast dla mas powyżej 299,1 amu widoczne jest, iż większe

wartości intensywności występują w grupach I oraz II, natomiast mniejsze intensywności można przyporządkować grupom III oraz IV.



Rys. 29. Poglądowe zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików glicerofosfolipidów w polaryzacji ujemnej dla tłuszczu śródmięśniowego.

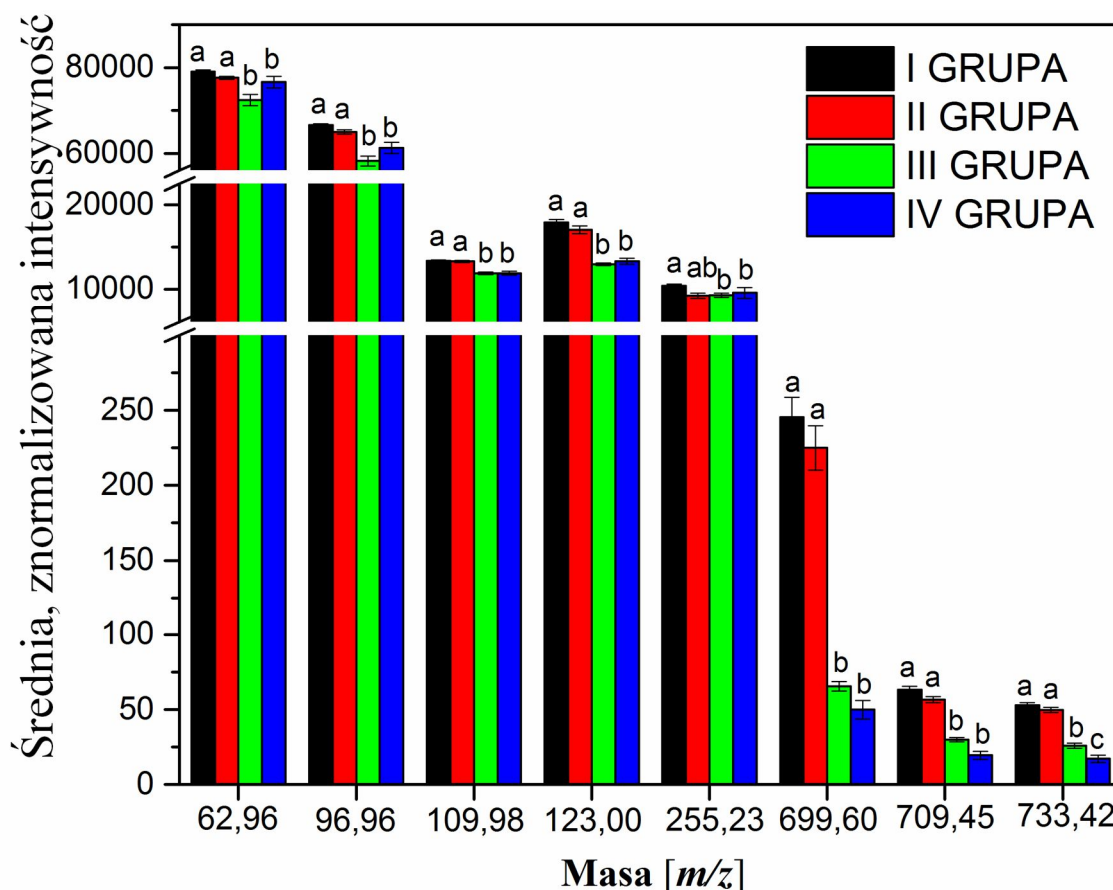
Analogiczna sytuacja występuje w przypadku pomiarów wykonanych na obszarach tłuszczu śródmięśniowego. Tak jak dla włókien mięśniowych, intensywności różnicują się między grupami dla mas większych od masy m/z 299,1, gdzie dla grupy IV wartości intensywności są najmniejsze.

Poniżej przedstawiono szczegółową analizę statystyczną zestawienia przedstawionego na **Rys. 28**. Ze względu na liczny zbiór charakterystycznych jonów dla tej grupy lipidowej, analizę podzielono na dwa etapy. Pierwszy etap dotyczy fosfatydylocholin (glicerofosfolipidy cholinowe), zaś drugi obejmuje pozostałe lipidy z grupy glicerofosfolipidów.

Tab. 8. Analiza wariancji wybranych jonów charakterystycznych fosfatydylocholin w polaryzacji ujemnej dla obszarów włókien mięśniowych. Zgodnie z analizą wariancji dla $F1 \geq 2,65$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Fragment PC28:0, PC32:0, PC34:1, PC34:2	62,96	$[PO_2]^-$	8,21
Fragment PC28:0, PC32:0, PC34:1, PC34:2	96,96	$[PO_4H_2]^-$	14,81
Fragment PC28:0, PC32:0, PC34:1, PC34:2	109,98	$[CH_3O_4P]^-$	17,04
Fragment PC28:0, PC32:0, PC34:1, PC34:2	123,00	$[C_2H_4PO_4]^-$	41,15
Fragment PC32:0, PC34:1, PC34:2	255,23	$[C_{16}H_{31}O_2]^-$	3,83
PC34:1	699,60	$[C_{39}H_{72}O_8P]^-$	71,22
PC32:0	709,45	$[C_{40}H_{80}NO_8P]^-$	84,97
PC34:2	733,42	$[C_{42}H_{80}NO_8P]^-$	82,16

W **Tab. 8** zawarto wybrane charakterystyczne jony fosfatydylocholiny, których intensywności poddano następnie szczegółowej analizie. Dla wszystkich jonów analiza wariancji ANOVA wyznaczyła wartości statystyki F_1 jako większe od wartości krytycznej dla określenia statystycznie istotnej różnicy. Otrzymane wyniki zaprezentowano w postaci histogramu na **Rys. 30**, w celu zobrazowania istniejących różnic.



Rys. 30. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, charakterystycznych jonów fosfatydylocholin z obszarów włókien mięśniowych. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych fosfatydylocholin) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Na zaprezentowanym histogramie można dostrzec kilka zależności. Pierwsza dotyczy wartości intensywności dla pierwszych pięciu jonów, począwszy od najmniejszej masy. Widoczna jest zdecydowana różnica w poziomach intensywności tych jonów w stosunku do zaprezentowanych pozostałych trzech.

Kolejne zależności można dostrzec analizując wyniki uzyskane z przeprowadzonego testu Tukey'a. I tak, istotnie wyższe wartości intensywności, dla praktycznie wszystkich wymienionych jonów, poza fosfatydylocholiną PC34:2 (m/z 733,42) oraz fragmentem PC32:0, PC43:1, PC34:2 (m/z 255,23), występują w grupie I oraz II w porównaniu z grupą III i IV, między którymi różnice są nieistotne statystycznie. W przypadku jonu PC34:2 (m/z 733,42) najwyższe wartości intensywności również odnotowano w grupie I oraz II, natomiast istotnie najniższe w grupie IV, a wartości intensywności grupy III plasowały się na

pośrednim poziomie. Z kolei, analizując jon fragmentacyjny PC32:0, PC34:1, PC34:2 (m/z 255,23) istotne statystycznie różnice odnotowano jedynie pomiędzy grupą I oraz III i IV, gdzie wyższe wartości intensywności tego jonu stwierdzono w grupie I w stosunku do grupy III i IV.

Uzyskane wyniki dla włókien mięśniowych wskazują na analogiczne tendencje charakterystycznych jonów w tej grupie lipidowej. Oznacza to, że w grupach żywieniowych, w których zastosowano suplementację jednym typem oleju roślinnego, zawartości fosfatydylocholin wzrosły w stosunku do grupy III (gdzie zastosowano kombinację olejów roślinnych) oraz grupy IV, w której nie zastosowano suplementacji olejami roślinnymi. Przewaga w intensywnościach dla pierwszych dwóch grup oraz przedstawiony w poprzednim podrozdziale wzrost zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest bardzo dobrym prognostykiem w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. Jak podają Liu i Ma [275], istnieje chemio-prewencyjny mechanizm działania glicerofosfolipidów zawierający kwasy tłuszczowe z rodziny ω -3. Mechanizm ten oparty jest przede wszystkim na możliwości modyfikacji płynności i przepuszczalności błon komórkowych, jak i na słabym powinowactwie tego typu fosfolipidów do cząsteczek cholesterolu. Dzięki takim mechanizmom spada prawdopodobieństwo powstawania tzw. tratw lipidowych, będących dynamicznymi domenami o dużej zawartości cholesterolu i fosfolipidów bogatych w nasycone kwasy tłuszczowe, których zwiększoną zawartość stwierdzono w błonach komórek nowotworowych (m.in. raka piersi i stercza) [276].

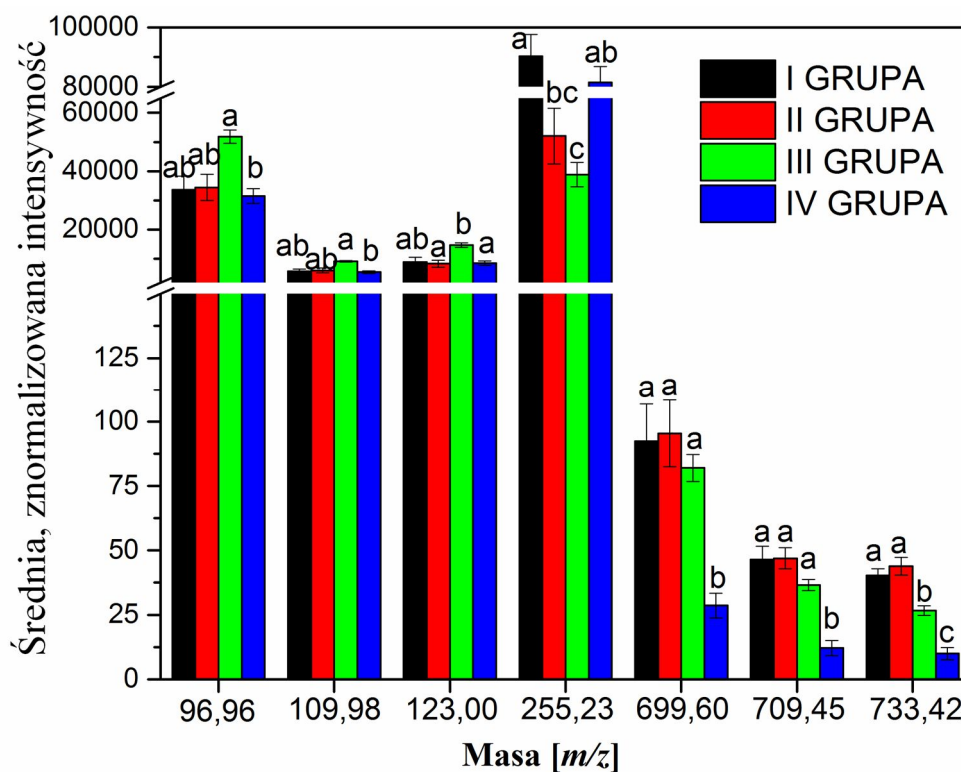
Wiedza na temat możliwości modyfikacji zawartości cząsteczek z rodziny fosfatydylocholin jest niezwykle przydatna. W wyniku starzenia się organizmu zmienia się skład błon komórkowych, efektem tego jest spadek zawartości fosfolipidów przy równoczesnym wzroście ilości cząsteczek cholesterolu. Mechanizm ten jest wyjątkowo niebezpieczny dla komórek układu immunologicznego oraz nerwowego, dla których procesy sygnalizacji komórkowej są wyjątkowo istotne [274]. W pracy Rivnay i in. [277] wykazano, iż suplementacja fosfatydylocholiną poprawia funkcjonowanie błon komórkowych u myszy powyżej 20 miesiąca życia, co objawiało się wzmocnieniem odpowiedzi proliferacyjnej. Dodatkowo, z poziomem spożycia fosfatydylocholin wiąże się również obniżenie stężenia całkowitego cholesterolu oraz frakcji LDL w osoczu krwi, przez co zmniejsza się ryzyko wystąpienia chorób układu krwionośnego [278].

Analizę dotyczącą wyników uzyskanych dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego zawarto w **Tab. 9**.

Tab. 9. Analiza wariancji wybranych jonów charakterystycznych fosfatydylocholin w polaryzacji ujemnej dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_{1 \geq 2,65}$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Fragment PC28:0, PC32:0, PC34:1, PC34:2	62,96	$[\text{PO}_2]^-$	2,54
Fragment PC28:0, PC32:0, PC34:1, PC34:2	96,96	$[\text{PO}_4\text{H}_2]^-$	2,88
Fragment PC28:0, PC32:0, PC34:1, PC34:2	109,98	$[\text{CH}_3\text{O}_4\text{P}]^-$	2,81
Fragment PC28:0, PC32:0, PC34:1, PC34:2	123,00	$[\text{C}_2\text{H}_4\text{PO}_4]^-$	3,84
Fragment PC32:0, PC34:1, PC34:2	255,23	$[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2]^-$	8,08
PC34:1	699,60	$[\text{C}_{39}\text{H}_{72}\text{O}_8\text{P}]^-$	8,37
PC32:0	709,45	$[\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{NO}_8\text{P}]^-$	15,85
PC34:2	733,42	$[\text{C}_{42}\text{H}_{80}\text{NO}_8\text{P}]^-$	28,28

W przeciwieństwie do wyników dla włókien mięśniowych, w przypadku tłuszczu śródmięśniowego nie dla każdego jonu analiza wariancji ANOVA wykazała istotną statystycznie różnicę. Z tabeli wynika, iż dla pierwszego fragmentu fosfatydylocholin o najmniejszej masie wartość współczynnika F_1 jest mniejsza od wartości krytycznej. Z tego powodu na **Rys. 31** zaprezentowano histogram dla 7 charakterystycznych mas w przypadku tej grupy lipidowej.



Rys. 31. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, charakterystycznych jonów fosfatydylocholin z obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych fosfatydylocholin) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Z przedstawionego histogramu wynika, iż w przypadku dwóch jonów odpowiadających fragmentom PC 28:0, PC32:0, PC34:1, PC 34:2 o masach m/z 96,96 oraz m/z 109,98 istotne statystycznie różnice wykazano tylko między III oraz IV grupą, gdzie istotnie większe intensywności stwierdzono w grupie III w stosunku do IV. Pomędzy pozostałymi grupami nie odnotowano istotnych statystycznie różnic. W przypadku trzeciego fragmentu o masie m/z 123 (fragment PC28:0, PC32:0, PC34:1, PC34:2) istotne różnice odnotowano pomiędzy grupą II, III i IV, gdzie wyższe wartości intensywności przypadają dla grupy III w porównaniu do grupy II i IV. Dla kolejnego, charakterystycznego fragmentu dla fosfatydylocholin o masie m/z 255,23, istotne statystycznie wyższe wartości intensywności stwierdzono w grupie I w stosunku do grupy II i III, między którymi różnice nie były istotne statystycznie. Grupa III ponadto cechowała się istotnie niższymi wartościami intensywności w porównaniu z grupą IV. Warto podkreślić, że intensywności dotychczas opisanych fragmentów fosfatydylocholin były o około trzy rzędy wielkości większe w porównaniu z pozostałymi jonami molekularnymi. Analizując dwa kolejne jony fosfatydylocholin PC34:1 (m/z 699,60) oraz PC32:0 (m/z 709,45), wykazano podobne proporcje międzygrupowe. W tym przypadku, istotnie mniejsze wartości średnich intensywności można przypisać grupie IV w stosunku do pozostałych grup żywieniowych. Analiza intensywności jonu PC 34:2 (m/z 733,42) wykazała, że podobnie jak w przypadku włókien mięśniowych, najwyższe wartości intensywności odnotowano w grupie I oraz II, a najniższe w grupie IV. Wartości intensywności tego jonu w grupie III plasowały się na pośrednim poziomie.

Uzyskane wyniki, dla obu struktur – włókien mięśniowych i tłuszczu śródmięśniowego, pokazują zdecydowanie większe wartości średnich intensywności fragmentów fosfatydylocholin (ok. 1000 krotnie) w stosunku do jonów macierzystych tych molekuł. Co więcej, proporcje pomiędzy średnimi wartościami intensywności dla badanych grup w przypadku włókien mięśniowych są analogiczne pomiędzy fragmentami molekuł, a jonami macierzystymi. Odmienna sytuacja jest w przypadku tłuszczu śródmięśniowego, dla którego występują różnice w cechach histogramów dla jonów fragmentacyjnych i macierzystych. Powodem tego jest fakt, iż dane fragmenty pochodzą również od innych molekuł, zważywszy na ich stosunkowo niewielkie masy, lub też fragmenty te mogą być produktami ponownej fragmentacji po wybiciu z badanej struktury.

Wcześniejsze badania wskazują, iż tłuszcz śródmięśniowy w znacznym stopniu może determinować skład lipidowy mięsa i co istotne, zawiera również znaczną ilość fosfolipidów [279]. Dla większości wybranych mas odpowiadających fragmentom i jonom macierzystych związków tworzących tą klasę lipidową, dla włókien mięśniowych, można zauważyć tą samą tendencję. Mianowicie, wartości średnich znormalizowanych intensywności dla pierwszych dwóch grup przewyższają poziomami pozostałe dwie grupy. Dodatkowo, w przypadku wyróżnionych trzech jonów molekularnych, różnica ta jest bardziej znacząca. Analizując z kolei wyniki dla tłuszczu śródmięśniowego, gdzie w przypadku

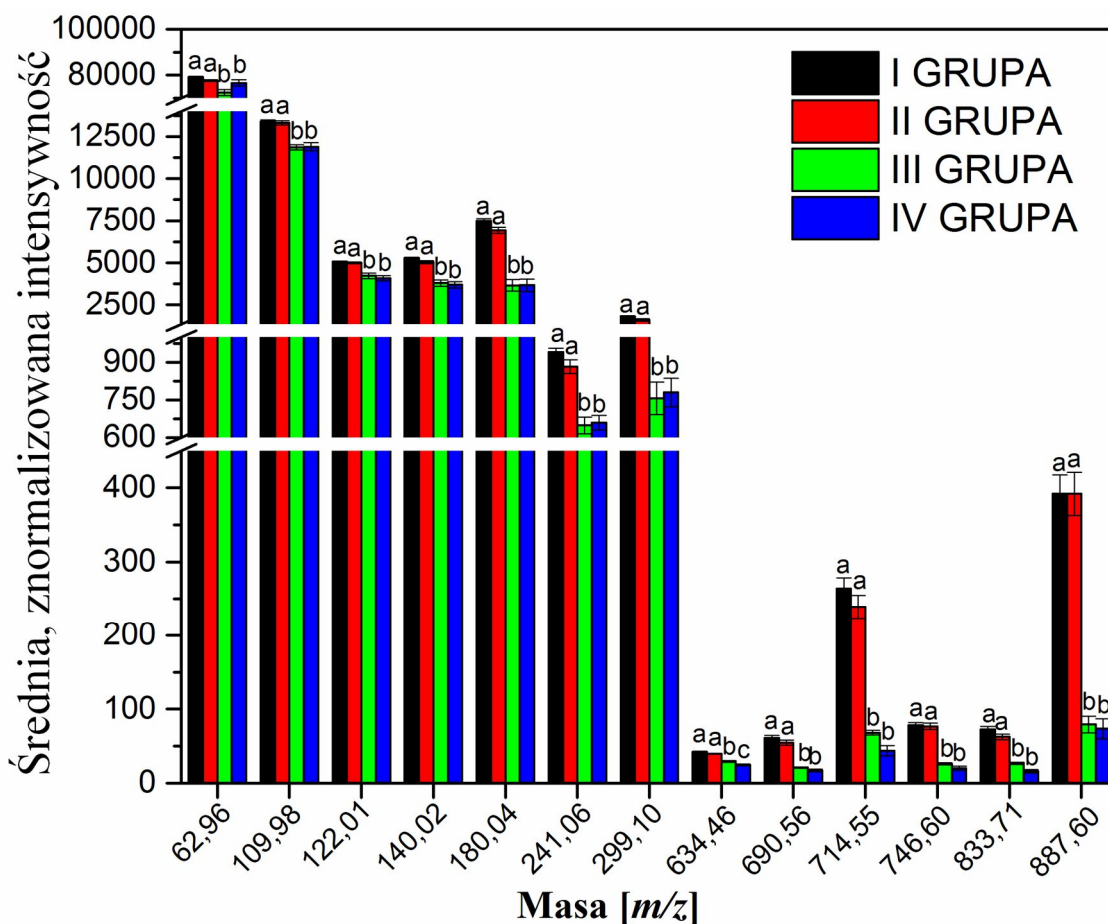
fragmentów cząsteczek z rodziny fosfatydylocholin nie ma wyróżniającej się tendencji, to dla jonów macierzystych widoczna jest przewaga grup suplementowanych olejami roślinnymi. Przytoczone wyniki wskazują, iż po suplementacji olejami roślinnymi, a w przypadku włókien mięśniowych w szczególności jednym typem oleju (grupa I oraz grupa II), wzrasta poziom związków z rodziny fosfatydylocholin.

Przechodząc do pozostałych cząsteczek z grupy glicerofosfolipidów, w **Tab. 10, 11** przedstawiono wyniki dla wybranych, charakterystycznych mas w przypadku glicerofosfolipidów innych niż fosfatydylocholin, takich jak fosfatydyloetanoloamina (PE) oraz fosfatydyloinozytol (PI).

Tab. 10. Analiza wariancji wybranych jonów charakterystycznych dla wybranych glicerofosfolipidów w polaryzacji ujemnej dla obszarów włókien mięśniowych. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_{1 \geq 2,65}$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Fragment PI, PE 28:0, PE 32:0	62,96	$[\text{PO}_2]^-$	8,21
Fragment PE 28:00	109,98	$[\text{CH}_3\text{O}_4\text{P}]^-$	17,04
Fragment PE 32:00	122,01	$[\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_3\text{P}]^-$	27,54
Fragment PE 28:0, PE 32:0, PE34:1	140,02	$[\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_4\text{P}]^-$	46,64
Fragment PE 28:0, PE 32:0	180,04	$[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_4\text{P}]^-$	75,13
Fragment PI 34:2	241,06	$[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{PO}_8]^-$	42,22
Fragment PI 34:2	299,10	$[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{PO}_9]^-$	58,72
Fosfatydyloetanoloamina PE 28:0	634,46	$[\text{C}_{33}\text{H}_{65}\text{NO}_8\text{P}]^-$	62,66
Fosfatydyloetanoloamina PE 32:0	690,56	$[\text{C}_{37}\text{H}_{73}\text{NO}_8\text{P}]^-$	60,95
Fosfatydyloetanoloamina PE 34:1	714,55	$[\text{C}_{39}\text{H}_{73}\text{NO}_8\text{P}]^-$	77,83
Fosfatydyloetanoloamina PE 36:0	746,60	$[\text{C}_{41}\text{H}_{81}\text{NO}_8\text{P}]^-$	76,39
Fosfatydyloinozytol PI 34:2	833,71	$[\text{C}_{43}\text{H}_{78}\text{PO}_{13}]^-$	59,51
Fosfatydyloinozytol PI 38:3	887,60	$[\text{C}_{47}\text{H}_{84}\text{O}_{13}\text{P}]^-$	54,10

Dla wszystkich wymienionych mas analiza wariancji ANOVA wykazała istotne statystycznie różnice, z tego względu na histogramach kolumnowych umieszczonych na **Rys. 32** zawarto wszystkie masy z **Tab. 10**.



Rys. 32. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, charakterystycznych jonów wybranych glicerofosfolipidów dla obszarów włókien mięśniowych. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych glicerofosfolipidów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Po analizie testu Tukey'a można zauważyć, podobnie jak to było w przypadku fosfatydylocholiny, iż praktycznie dla wszystkich mas, istotnie wyższe średnie wartości znormalizowanych intensywności występują w grupie I oraz II w porównaniu do grupy III i IV. Wyjątek stanowi jedynie jon PE 28:0 (m/z 634,46), dla którego istotnie niższe wartości intensywności odnotowano w grupie IV w stosunku do grupy III. Otrzymane zależności mogą stanowić potwierdzenie tezy, iż zwiększony dostęp do fosfatydyloetanolaminy podwyższa konwersję do fosfatydylocholiny ze względu na przekształcanie PE do PC dzięki aktywności N-metylotransferazy fosfatydyloetanolaminowej [280].

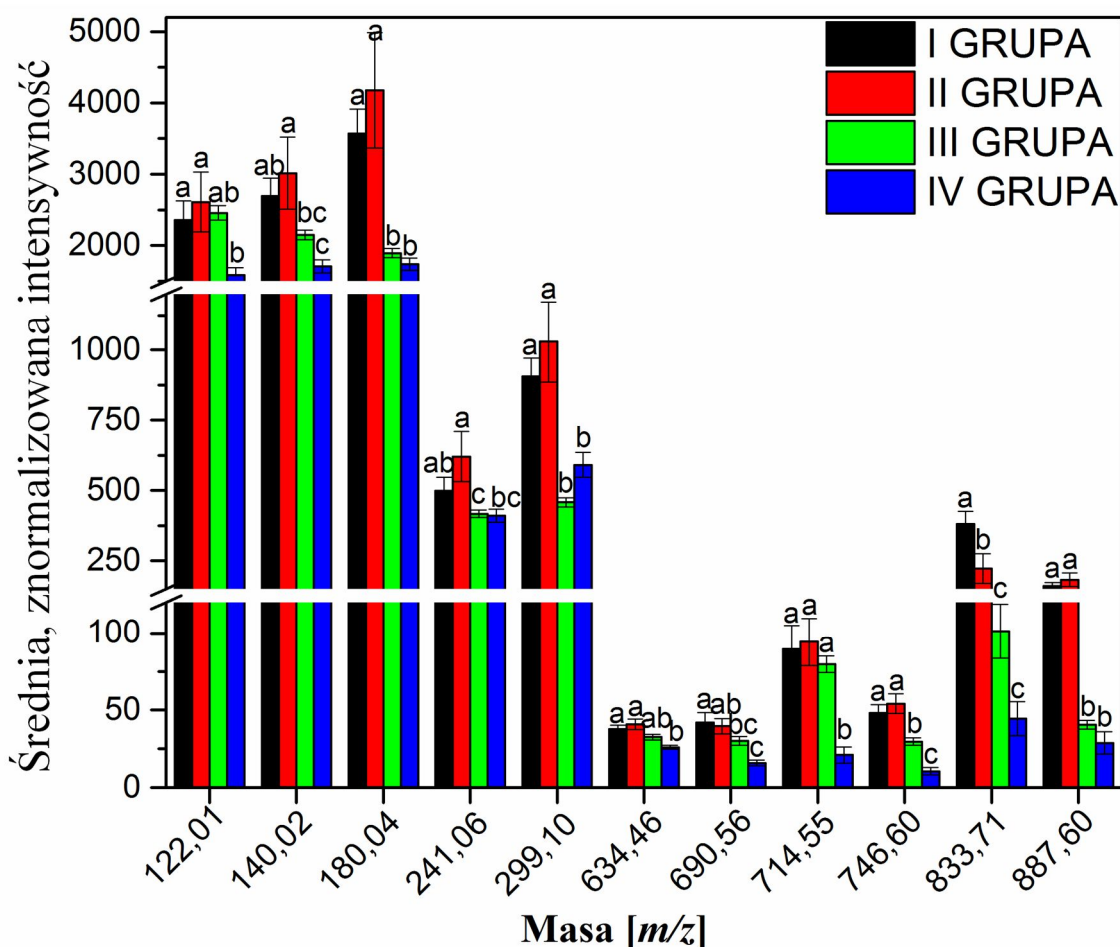
Kolejny wniosek wynikający z tabeli to fakt, iż dla mas m/z 714,55 (PE 34:1) oraz 887,60 (PI 38:3), średnie wartości znormalizowanych intensywności w grupie I oraz II co najmniej czterokrotnie przewyższają wartości uzyskane dla grupy III i IV. Warto zauważyć, iż dla siedmiu pierwszych jonów (m/z 62,96; 109,98; 122,01; 140,02; 180,04; 241,06; 299,10), a więc wszystkich jonów fragmentacyjnych, wartości średnich intensywności są wielokrotnie większe w porównaniu do pozostałych jonów molekularnych.

W przypadku tłuszczu śródmięśniowego średnie wartości znormalizowanych intensywności mas charakterystycznych glicerofosfolipidów w polaryzacji ujemnej przedstawiono w **Tab. 11**.

Tab. 11. Analiza wariancji wybranych jonów charakterystycznych wybranych glicerofosfolipidów w polaryzacji ujemnej dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_{1,1} \geq 2,65$ występuje między średnimi nie jest znacząca na poziomie ufności 0,05

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Fragment PI, PE 28:0, PE 32:0	62,96	$[\text{PO}_2]^-$	1,64
Fragment PE 28:00	109,98	$[\text{CH}_3\text{O}_4\text{P}]^-$	2,61
Fragment PE 32:00	122,01	$[\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_3\text{P}]^-$	4,42
Fragment PE 28:0, PE 32:0, PE34:1	140,02	$[\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_4\text{P}]^-$	6,66
Fragment PE 28:0, PE 32:0	180,04	$[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_4\text{P}]^-$	12,15
Fragment PI 34:2	241,06	$[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{PO}_8]^-$	4,64
Fragment PI 34:2	299,10	$[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{PO}_9]^-$	14,50
Fosfatydyloetanolamina PE 28:0	634,46	$[\text{C}_{33}\text{H}_{65}\text{NO}_8\text{P}]^-$	6,04
Fosfatydyloetanolamina PE 32:0	690,56	$[\text{C}_{37}\text{H}_{73}\text{NO}_8\text{P}]^-$	9,19
Fosfatydyloetanolamina PE 34:1	714,55	$[\text{C}_{39}\text{H}_{73}\text{NO}_8\text{P}]^-$	8,26
Fosfatydyloetanolamina PE 36:0	746,60	$[\text{C}_{41}\text{H}_{81}\text{NO}_8\text{P}]^-$	20,54
Fosfatydyloinozytol PI 34:2	833,71	$[\text{C}_{43}\text{H}_{78}\text{PO}_{13}]^-$	23,12
Fosfatydyloinozytol PI 38:3	887,60	$[\text{C}_{47}\text{H}_{84}\text{O}_{13}\text{P}]^-$	33,49

Analiza ANOVA przedstawiona w tabeli dla dwóch jonów fragmentacyjnych o najmniejszych masach nie wykazała istotnych statystycznie różnic. Te dwie masy zostały więc pominięte w zestawieniu umieszczonym na **Rys. 33**.



Rys. 33. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, charakterystycznych jonów wybranych glicerofosfolipidów dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych glicerofosfolipidów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Wyniki zestawione na histogramie charakteryzują się pewnymi wspólnymi cechami. Mianowicie, prawie dla wszystkich mas, tylko poza fragmentem o masie 241,06 (PI 34:2), w grupie I oraz II wykazano istotnie wyższe intensywności w porównaniu z grupą IV. Z kolei, fragment PE 28:0, PE 32:0, PE 34:1 (m/z 140,02) oraz fragment PI 34:2 o masie m/z 241,06 cechowały się wyższą intensywnością w grupie II w stosunku do grupy III i IV, między którymi różnice nie były istotne statystycznie. Jon fragmentacyjny PE 28:0, PE 32:0 (m/z 180,04) oraz jon fragmentacyjny PI 34:2 o masie m/z 299,10, a także jon PI 38:3 (m/z 887,60) cechowały się podobnymi zależnościami w stosunku do analizowanych grup żywieniowych. Dla tych jonów istotnie wyższy poziom intensywności odnotowano w grupie I oraz II w stosunku do grupy III i IV. Rodzaj żywienia zróżnicował także intensywności pozostałych jonów. I tak, jon PE 34:1 (m/z 714,55) charakteryzował się istotnie niższym poziomem intensywności w grupie IV stosunku do pozostałych grup żywieniowych. Również w grupie IV stwierdzono najniższy poziom intensywności w przypadku jonu PE 36:0 (m/z 746,60). Z kolei, najwyższy poziom intensywności odnośnie tego jonu wykazano w grupie I oraz II, natomiast poziom intensywności oszacowany w grupie III plasował się na pośrednim

poziomie. Kolejny z omawianych jonów o masie 833,71, PI 34:2, najwyższą wartość intensywności osiągnął w grupie I, a najniższą w grupie III i IV. Wartości intensywności grupy II natomiast przyjmowały wartości pośrednie.

Fosfolipidy zawierające etanoloaminę oraz inozytol, a więc PE i PI, odznaczają się ważnymi właściwościami biologicznymi oraz biorą udział w wielu szlakach biologicznych w żywych organizmach. Jedną z istotnych reakcji, w której bierze udział PE jest modulacja stężenia homocysteiny w osoczu krwi, będącej czynnikiem ryzyka rozwoju zmian miażdżycowych oraz zakrzepowych [280]. A więc, dostarczanie do organizmu zbyt wysokiej dawki PE mogłoby za pomocą tego szlaku niekorzystnie wpłynąć na stan zdrowia żywego organizmu. Równocześnie, jak podaje Eros i in. [281] suplementacja PE wraz z PC oraz N-acylofosfatydyloetanoloaminą wpływa na hamowanie ostrych stanów zapalnych i stanowi nowatorską drogę zapobiegawczą lub farmakoterapeutyczną w patologiach układu immunologicznego. W przypadku PI natomiast, jedną z istotnych ról jaką odgrywa to pośredniczenie w odpowiedzi komórkowej na bodźce zewnętrzne. Ale nie tylko, według badań Shirouchi i in. [282], dieta szczurów wzbogacona w olej sojowy, a dzięki temu suplementowana PI, wpływa hamująco na hipercholesterolemię i gromadzenie się cholesterolu w surowicy, co powiązано z zwiększonym wydalaniem kwasu żółciowego.

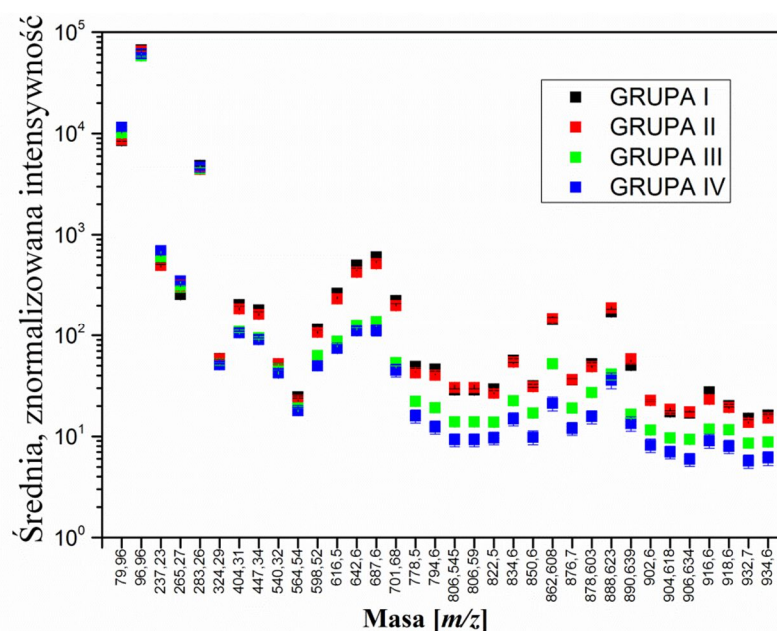
Ze względu na duże znaczenie biologiczne obu lipidów, wiedza na temat możliwości modyfikacji ich zawartości w strukturach biologicznych, takich jak tkanki, jest wysoce przydatna. Informacje, jakie uzyskano w przeprowadzonej analizie świadczą, iż technika spektrometryczna TOF-SIMS umożliwia uzyskanie użytecznych, również w ocenie ilościowej, informacji i stwarza nowe możliwości do obserwacji zmian wyżej wymienionych lipidów w układach biologicznych poddanych różnym czynnikom modyfikujących profil lipidowy układów biologicznych.

4.4. Sfingolipidy

Kolejna grupa lipidowa, sfingolipidy, których cząsteczki są elementami strukturalnymi zewnętrznych warstw błon biologicznych obok fosfolipidów, glikolipidów i steroidów, warunkują kształt komórki, inicjują liczne szlaki sygnałowe jak również pełnią funkcję wtórnych przekaźników sygnałów [283]. Głównym szkieletem w cząsteczkach należących do tej grupy związków, w odróżnieniu od większości fosfolipidów, jest sfingozyna zbudowana z osiemnastowęglowego łańcucha [284]. Do tej klasy lipidów należą ceramidy, będące połączeniem amino-alkoholowej sfingozyny z resztą kwasu tłuszczowego, sfingomieliny (SM) powstałe w wyniku kondensacji ceramidu i fosfatydylocholine, oraz glikosfingolipidy będące produktem reakcji ceramidu i reszt cukrowych [285]. Sfingolipidy pełnią również ważną rolę w wielu fizjologicznych i patofizjologicznych procesach zachodzących w układzie pokarmowym, stanowią około 35% wszystkich frakcji lipidowych obecnych w układzie pokarmowym [286]. Znajdujące się na powierzchni szczytowej enterocytów, będących

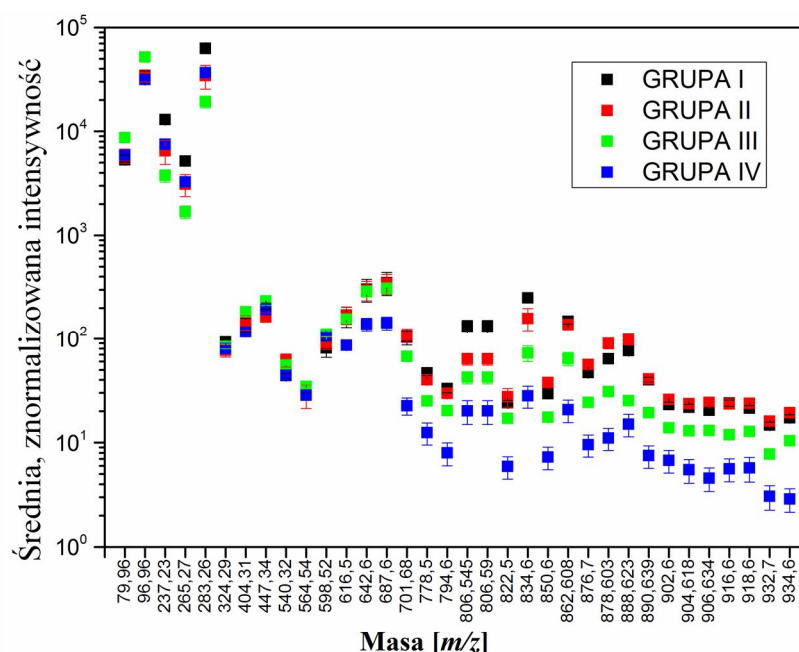
komórkami jelita cienkiego, glikosfingolipidy zabezpieczają nabłonek jelitowy przed uszkodzeniem przez sole kwasów żółciowych oraz enzymy trawienne [287]. W wielu pracach podkreśla się również znaczenie sfingolipidów w układzie krwionośnym, gdzie pełnią funkcje strukturalne, determinując właściwości błon biologicznych kardiomiocytów, oraz działają jak wtórne przekaźniki w procesach dkomórkowej transmisji sygnałów [288].

Na wykresie **Rys. 34** przedstawiono wartości średnie znormalizowanych intensywności wszystkich zebranych charakterystycznych jonów sfingolipidów w polaryzacji ujemnej w przypadku obszarów zidentyfikowanych jako włókna mięśniowe.



Rys. 34. Poglądowe zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików sfingolipidów w polaryzacji ujemnej, dla włókien mięśniowych.

Uzyskane dane upoważniają do stwierdzenia, iż w przypadku tej grupy lipidowej występuje widoczna różnica pomiędzy czterema grupami eksperymentalnymi. Praktycznie dla wszystkich mas, można uznać, iż najmniejsze wartości intensywności występują w grupie IV, a największe wartości intensywności przypadają w grupach I lub II. Jedynie dla najmniejszych mas występują odstępstwa, jednak jest to związane z faktem, iż te masy mogą odpowiadać fragmentom cząsteczek innych lipidów. **Rys. 35** prezentuje dane dla tych samych jonów emitowanych z obszarów tłuszczu śródmięśniowego.



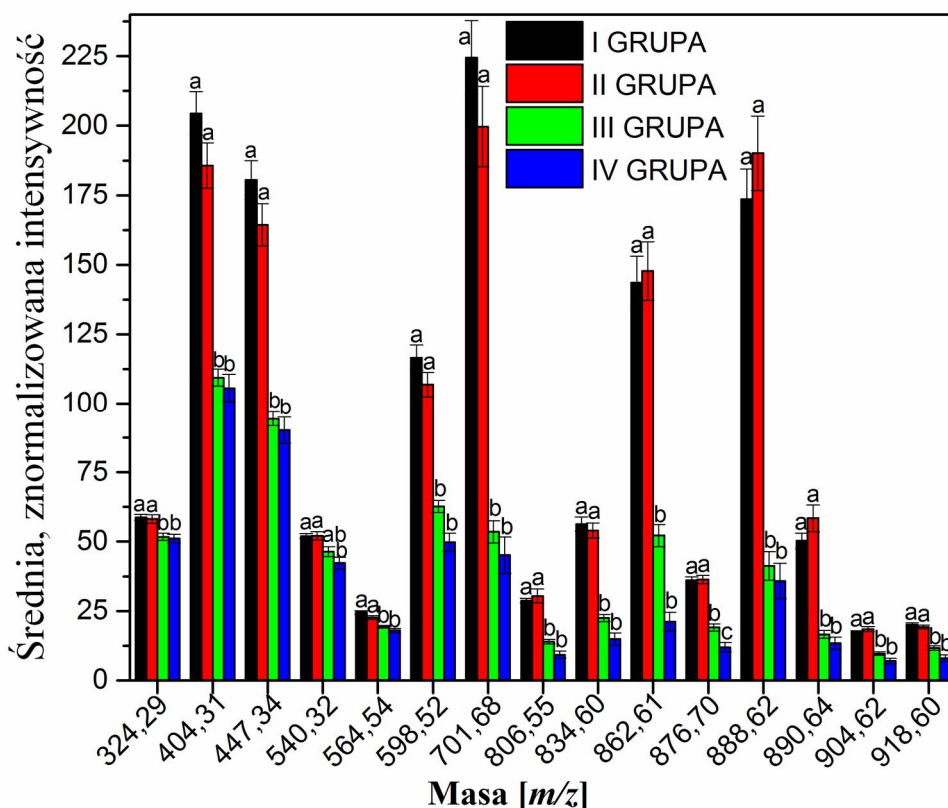
Rys. 35. Poglądowe zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików sfingolipidów w polaryzacji ujemnej dla tłuszczu śródmięśniowego.

Rezultaty otrzymane dla tłuszczu śródmięśniowego są zgodne z zaobserwowanymi cechami dla tej grupy lipidowej we włóknach mięśniowych. Dla większości mas (za wyjątkiem najmniejszych mas z przedziału m/z 79,96-447,34) występuje zróżnicowanie między grupami pod względem wartości intensywności. Najmniejsze wartości można zauważyć dla grupy IV, natomiast największe występują w grupie I oraz II. W **Tab. 12, 13** umieszczono szczegółową analizę statystyczną otrzymanych wartości intensywności pod względem różnic występujących pomiędzy czterema grupami żywieniowymi.

Tab. 12. Analiza wariancji wybranych jonów charakterystycznych sfingolipidów w polaryzacji ujemnej dla obszarów włókien mięśniowych. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_1 \geq 2,65$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Ceramid 36:1	324,29	$[C_{20}H_{38}NO_2]^-$	14,34
Sfingomielina 34:1	404,31	$[C_{20}H_{39}NO_5P]^-$	55,23
Sfingomielina 34:1	447,34	$[C_{22}H_{44}N_2O_5P]^-$	56,28
Sulfatyd 42:2	540,32	$[C_{24}H_{46}SNO_{10}]^-$	8,21
Ceramid 36:1	564,54	$[C_{36}H_{70}NO_3]^-$	21,95
Sfingomielina 34:1	598,52	$[C_{34}H_{65}NO_5P]^-$	66,26
Sfingomielina 34:1	701,68	$[C_{39}H_{78}N_2O_6P]^-$	61,10
Sulfatyd C18	806,55	$[C_{42}H_{80}SNO_{11}]^-$	44,03
Sulfatyd C20	834,60	$[C_{44}H_{84}SNO_{11}]^-$	66,84
Sulfatyd C22	862,61	$[C_{46}H_{88}SNO_{11}]^-$	52,10
Sulfatyd C23	876,70	$[C_{47}H_{90}SNO_{11}]^-$	59,46
Sulfatyd C24:1 oraz 42:2	888,62	$[C_{48}H_{90}SNO_{11}]^-$	57,66
Sulfatyd C24	890,64	$[C_{48}H_{92}SNO_{11}]^-$	45,68
Sulfatyd C25	904,62	$[C_{48}H_{90}SNO_{12}]^-$	44,01
Sulfatyd C26	918,60	$[C_{49}H_{92}SNO_{12}]^-$	39,54

Jak wynika z tabeli, dla wszystkich zamieszczonych mas analiza wariancji ANOVA wykazała istotne statystycznie różnice międzygrupowe. Można również zauważyć, iż otrzymane wartości statystyki F_1 z testu ANOVA są stosunkowo duże względem wartości uzyskanych w uprzednich analizach.



Rys. 36. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, charakterystycznych jonów wybranych sfingolipidów dla obszarów włókien mięśniowych. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych sfingolipidów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Z przeprowadzonego testu Tukey'a wynika wniosek, iż dla wszystkich wybranych jonów charakterystycznych dla sfingolipidów nie występują różnice w wartościach intensywności między grupami I oraz II, jak również między grupą III oraz grupą IV, z wyjątkiem sulfatydu C23 (m/z 876,70), dla którego istotnie wyższe wartości intensywności odnotowano w grupie III w porównaniu do grupy IV. Co warto także podkreślić, wartości intensywności odnotowane w grupie I oraz II a więc, w grupie w której zastosowano olej sojowy jako źródło tłuszczu i w grupie, w której użyto oleju lnianego będącego źródłem tłuszczu roślinnego, były istotnie wyższe w porównaniu z wartościami intensywności odnotowanymi w grupie III, w której zastosowano kombinację obu tłuszczów roślinnych, jak również w grupie IV, gdzie zwierzęta suplementowane były łożem wołowym. Tylko w przypadku masy m/z 540,32 odpowiadającej sulfatydowi 42:2 wykazano brak istotnych zmian między grupami I oraz III.

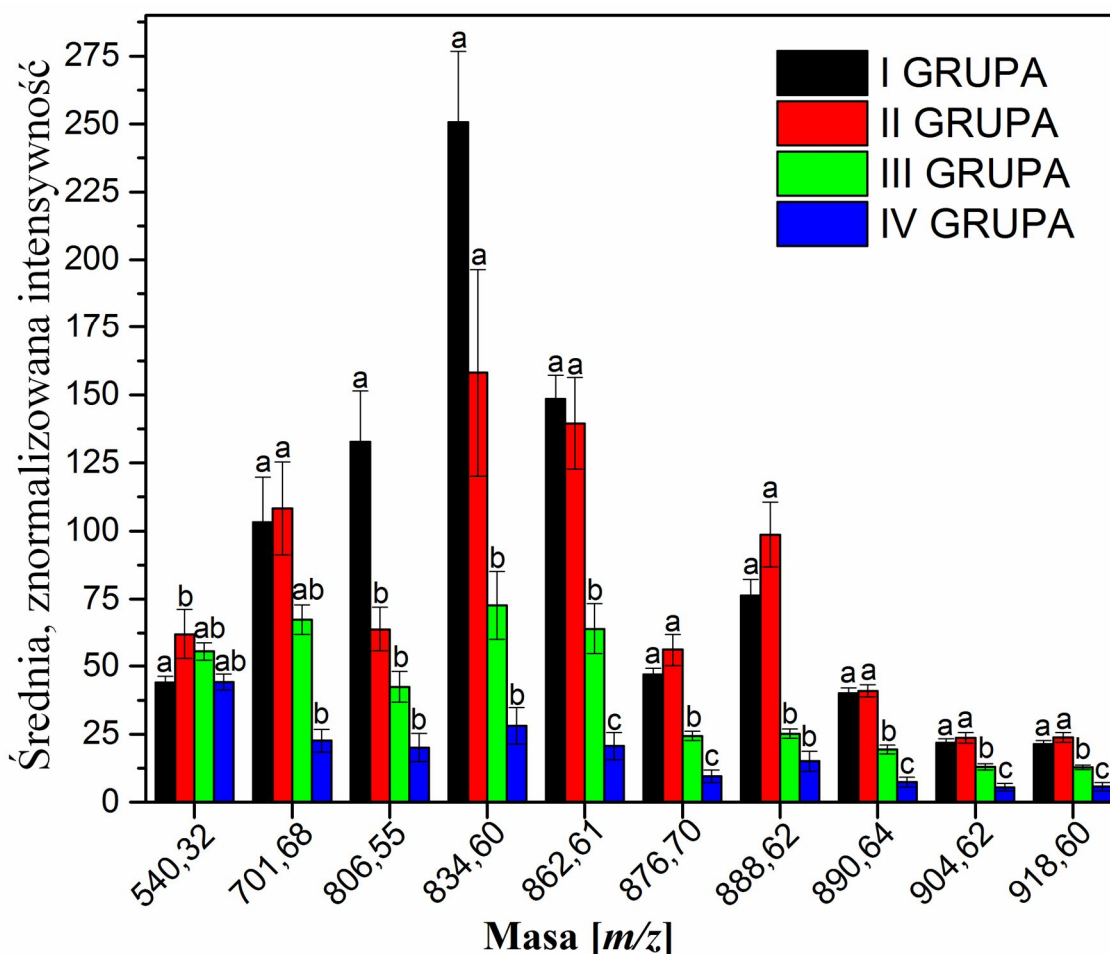
Objęte w niniejszej analizie cząsteczki ceramidów są odpowiedzialne za wewnątrzkomórkową sygnalizację oraz aktywację wielu enzymów prowadzących do apoptozy komórkowej [289, 290]. Jednym ze szlaków powstawania ceramidów

jest enzymatyczna hydroliza sfingomieliny, w przypadku otrzymanych wyników istnieje analogia w otrzymanych różnicach międzygrupowych dla sfingomielin i ceramidów. W obu przypadkach, w pierwszych dwóch grupach, wartości średnich intensywności są większe od pozostałych dwóch grup. Modrak i in. [291] wskazują, iż zwiększenie stężenia sfingomieliny może prowadzić do wzrostu ilości wewnątrzkomórkowych ceramidów, co w efekcie końcowym może prowadzić do inicjacji apoptozy komórkowej. Z kolei, Fincka i in. [292] analizując wpływ bogatej w tłuszcze diety na poziom ceramidów w mięśniu sercowym myszy z uwarunkowaną genetycznie nadekspresją wybranych receptorów regulujących metabolizm sfingolipidów wykazali, że wysokotłuszczowa dieta prowadzi do akumulacji ceramidu w mięśniu sercowym, przy czym zjawisko to związane jest również ze zmianą aktywności pewnych enzymów i receptorów w szlaku metabolicznym sfingolipidów. W **Tab. 13** zamieszczono wyniki odnoszące się do tłuszczu śródmięśniowego.

Tab. 13. Analiza wariancji wybranych jonów charakterystycznych sfingolipidów w polaryzacji ujemnej dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_1 \geq 2,65$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Ceramid 36:1	324,29	$[C_{20}H_{38}NO_2]^-$	2,51
Sfingomielina 34:1	404,31	$[C_{20}H_{39}NO_5P]^-$	2,49
Sfingomielina 34:1	447,34	$[C_{22}H_{44}N_2O_5P]^-$	2,06
Sulfatyd 42:2	540,32	$[C_{24}H_{46}SNO_{10}]^-$	4,25
Ceramid 36:1	564,54	$[C_{36}H_{70}NO_3]^-$	1,13
Sfingomielina 34:1	598,52	$[C_{34}H_{65}NO_5P]^-$	1,73
Sfingomielina 34:1	701,68	$[C_{39}H_{78}N_2O_6P]^-$	9,22
Sulfatyd C18	806,55	$[C_{42}H_{80}SNO_{11}]^-$	21,50
Sulfatyd C20	834,60	$[C_{44}H_{84}SNO_{11}]^-$	24,02
Sulfatyd C22	862,61	$[C_{46}H_{88}SNO_{11}]^-$	46,65
Sulfatyd C23	876,7	$[C_{47}H_{90}SNO_{11}]^-$	42,77
Sulfatyd C24:1 oraz 42:2	888,62	$[C_{48}H_{90}SNO_{11}]^-$	34,48
Sulfatyd C24	890,64	$[C_{48}H_{92}SNO_{11}]^-$	58,60
Sulfatyd C25	904,62	$[C_{48}H_{90}SNO_{12}]^-$	28,75
Sulfatyd C26	918,60	$[C_{49}H_{92}SNO_{12}]^-$	21,92

Jak można zauważyć, wartości testu wariancji ANOVA kształtują się nieco inaczej niż dla włókien mięśniowych. Wartości odnoszące się do obu mas przypisanych ceramidowi 36:1 są mniejsze niż graniczna wartość współczynnika F_1 informująca o istotnej statystycznie różnicy międzygrupowej. Stąd, masy te nie są obecne na **Rys. 37**. Analogiczny przypadek ma miejsce dla trzech z czterech mas charakterystycznych sfingomieliny 34:1.



Rys. 37. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, charakterystycznych jonów wybranych sfingolipidów dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych sfingolipidów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

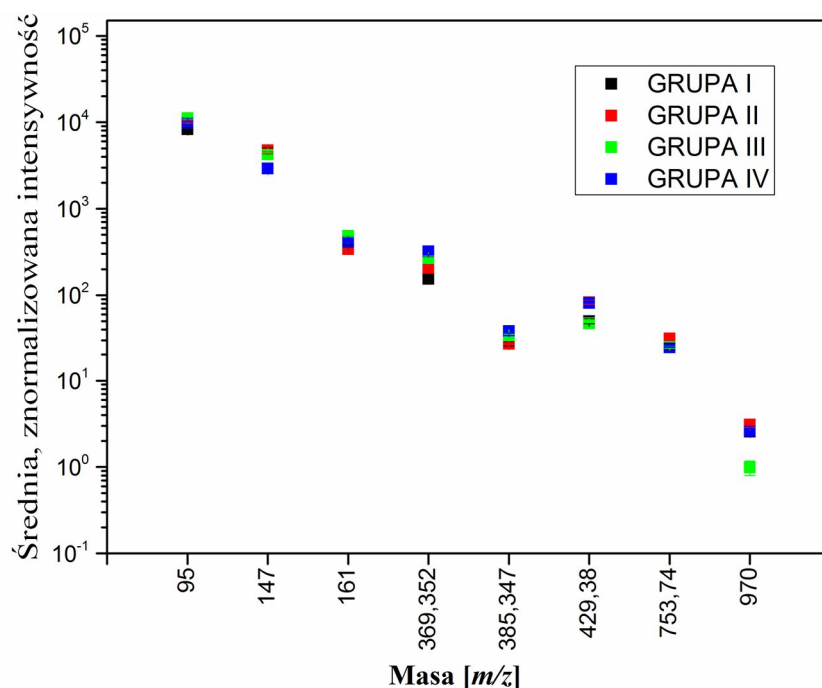
Jedyna masa jonu sfingomieliny 34:1, dla której wartość współczynnika F_1 informuje o istotnej statystycznie różnicy międzygrupowej, a więc masa m/z 701,68, ma znacząco wyższe wartości intensywności w grupie I oraz II w stosunku do wartości dla grupy IV. Natomiast, w przypadku sulfatydu 42:2, jon o masie m/z 540,32, istotne różnice odnotowano jedynie pomiędzy grupą I a II, gdzie wyższe wartości intensywności stwierdzono w grupie II. Analizując natomiast sulfatydy 42:2, jon o masie m/z 888,62, jak również sulfatydy C20 (m/z 834,60), istotnie wyższe intensywności odnotowano w grupie I oraz II w porównaniu do grupy III i IV, między którymi nie wykazano istotnych różnic. Z kolei, dla sulfatydu C18 (m/z 806,55) wartości intensywności w przypadku grupy I wzrosły istotnie w porównaniu z pozostałymi trzema grupami żywieniowymi. W przypadku pozostałych sulfatydów C22 (m/z 862,61), C23 (m/z 876,70), C24 (m/z 890,64), C25 (m/z 904,62) oraz C26 (m/z 918,60) stwierdzono podobne zależności. I tak, istotnie wyższymi wartościami intensywności cechowały się grupy I oraz II w porównaniu z grupą III i IV, w obrębie których grupa III charakteryzowała się wyższym poziomem intensywności.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że zarówno dla włókien mięśniowych jak i tłuszczu śródmięśniowego widoczna jest w większości przypadków zdecydowana przewaga w wartościach intensywności dla dwóch pierwszych grup, w których zastosowano odpowiednio olej sojowy oraz olej lniany, co świadczy o wpływie żywienia na profil lipidowy tej grupy tłuszczu. Przypuszczenia te potwierdzają badania Duan [286], w których wykazano, iż m. in. profil sfingolipidów przewodu pokarmowego, a w konsekwencji również sfingolipidów ogólnoustrojowych zależy bezpośrednio od rodzaju i składu stosowanej diety. Ponadto, otrzymane w niniejszej pracy wyniki dla tkanki mięśniowej są zgodne z tezą przedstawioną przez Duan'a [285], mówiącą iż ekspresja sfingolipidów w jelicie uwarunkowana jest składem diety, gdzie przeciętnie z pokarmem dostarczane jest ok. 350 mg sfingolipidów na dobę, przy czym pokarm roślinny jest źródłem ok. 50 mg. Z kolei, Sugawara i in. [293] podają, że jelitowa adsorpcja sfingolipidów pochodzenia roślinnego u szczurów podlega w znacznie mniejszym stopniu niż sfingolipidów pochodzenia zwierzęcego, co więcej trawienie sfingomieliny jest procesem powolnym i częściowym. U ludzi, jak wynika z badań Ohlsson i in. [294], znaczna część bo ok. 80% przyjmowanej z pokarmem sfingomieliny jest trawiona, natomiast pozostała część jest wydalana. Z przedstawionych danych wynika, iż ilość i profil sfingolipidów w poszczególnych układach żywego organizmu ma kluczowe znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu ustroju i warunkuje wiele fizjologicznych i patologicznych procesów. Tym bardziej staje się przydatna wiedza na temat możliwości modyfikacji składu i zawartości poszczególnych sfingolipidów poprzez dostarczane do organizmu pożywienie.

4.5. Sterole

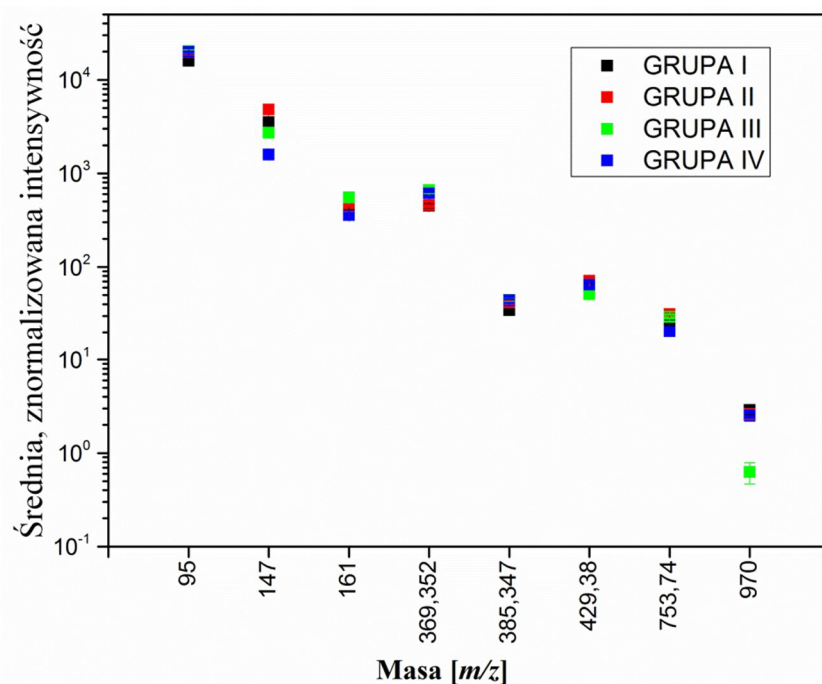
Kolejna grupa lipidów to sterole należące do alkoholi alicyklicznych z grupy steroidów. Cholesterol jest jednym z ważniejszych i najlepiej poznanych tłuszczu tej grupy, z tego względu, na tej cząsteczce została skupiona uwaga w niniejszej analizie. Ze względu na fakt, który znajduje potwierdzenie w innych pracach [207], iż ujemny sygnał jonów cholesterolu jest niski, poniżej przedstawione wyniki odnoszą się do pomiarów wykonanych w polaryzacji dodatniej.

Porównując znormalizowane i uśrednione wartości intensywności dla czterech badanych grup, zarówno w przypadku obszarów tłuszczu śródmięśniowego jak i włókien mięśniowych, można zaobserwować występowanie dających się określić tendencji. Efekty wprowadzonych programów żywieniowych na poziomy intensywności dla dodatnich jonów charakterystycznych w przypadku steroli można zaobserwować na poglądowych wykresach zamieszczonych na **Rys. 38** i **Rys. 39**, odpowiednio dla włókien mięśniowych i tłuszczu śródmięśniowego.



Rys. 38. Poglądowe zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików steroli w polaryzacji dodatniej dla włókien mięśniowych.

Rysunek ilustruje jak kształtują się poziomy intensywności dla ośmiu zebranych mas oznaczonych jako charakterystyczne dla steroli w polaryzacji dodatniej. Na zestawieniu nie jest możliwe określenie żadnych istotnych tendencji. Wartości intensywności nie różnicują się między grupami w sposób jednoznaczny.



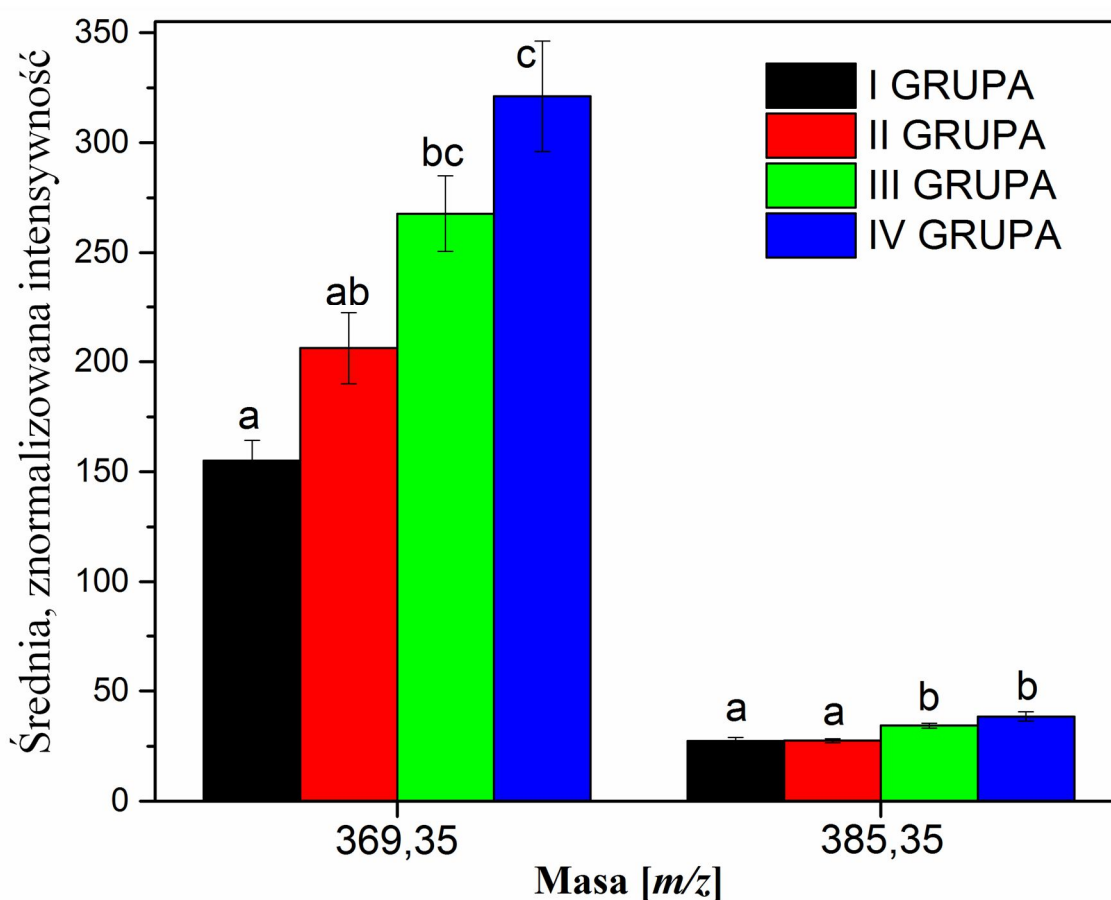
Rys. 39. Poglądowy wykres średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików steroli w polaryzacji dodatniej dla tłuszczu śródmięśniowego.

Również dla wykresu **Rys. 39** nie jest możliwe określenie wspólnych zależności dla wybranych jonów. Wykonano jednoczynnikową analizę ANOVA oraz test Tukey'a dla wybranych ośmiu mas charakterystycznych dla steroli, wyniki zamieszczono w **Tab. 14, 15**, odpowiednio dla włókien mięśniowych oraz tłuszczu śródmięśniowego. Do obserwacji zmian w poziomach steroli w poszczególnych grupach uwzględniono dwie charakterystyczne dla cholesterolu masy, m/z 385,3 a więc masę jonu molekularnego [cholesterol-H]⁺ oraz masę dla cholesterolu po utracie cząsteczki wody, m/z 369,4 ([cholesterol-H₂O+H]⁺).

Tab. 14. Analiza wariancji wybranych jonów charakterystycznych steroli w polaryzacji dodatniej dla obszarów włókien mięśniowych. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_1 \geq 2,65$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F1</i>
Cholesterol [M+H-H ₂ O] ⁺	369,35	[C ₂₇ H ₄₅] ⁺	14,25
Cholesterol [M+H] ⁺	385,35	[C ₂₇ H ₄₆ O] ⁺	15,07

Z powyższej tabeli widoczne jest, iż dla obu mas statystyka F_1 wykazała istotne różnice między czterema grupami eksperymentalnymi. Uzyskane różnice pomiędzy wartościami intensywności w sposób obrazowy przedstawia **Rys. 40**.



Rys. 40. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów wybranych steroli dla obszarów włókien mięśniowych. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych steroli) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Opierając się na wynikach zamieszczonych na rysunku można stwierdzić, że wprowadzenie diety różniącej się źródłem tłuszczu wpływa na zawartość cholesterolu w próbce tkanki mięśnia piersiowego brojlerów. W przypadku jonu m/z 369,35 istotnie wyższe wartości intensywności wykazano w grupie IV w stosunku do grupy I i II, pomiędzy którymi różnice nie były istotne statystycznie. W przypadku grupy III wartości intensywności tego jonu były istotnie wyższe w porównaniu z grupą I i równocześnie nie różniły się od wartości intensywności stwierdzonych dla grupy II i IV. Drugi jon, o masie m/z 385,35 będący jonem macierzystym, istotnie wyższą intensywność przyjmuje w grupie III i IV w stosunku do grup I oraz II.

Zaobserwowane w niniejszej pracy różnice w intensywnościach jonów cholesterolu pomiędzy grupami żywieniowymi zwierząt potwierdzają wcześniejsze obserwacje [295, 296], iż czynnik żywieniowy wpływa na poziom cholesterolu. Wartości otrzymane dla dwóch analizowanych jonów wskazują, iż żywienie ma istotny wpływ na poziom cholesterolu w tkankach. Wcześniejsze badania Xiccato i Trocino [297] nad wpływem suplementacji tłuszczem roślinnym w zbilansowanych dawkach pokarmowych dla królików również dowodzą, iż zastosowanie niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych o określonych proporcjach w diecie może wpłynąć na ograniczenie poziomu cholesterolu całkowitego w mięśniach i tłuszczu zapasowym. Opisana zależność jest efektem stymulacji bądź hamowania aktywności reduktazy znajdującej się w cytoplazmie hepatocytów (HMG CoA), będącej enzymem kontrolującym procesy syntezy cholesterolu. Równocześnie stwierdzono, co ma kluczowe znaczenie z punktu widzenia przeprowadzonego eksperymentu, iż spożywane przez człowieka mięso o obniżonej zawartości cholesterolu (np. wieprzowina) skutkuje znaczącym spadkiem stężenia cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL w profilu lipidowym osocza [298]. Obie opisane zależności skłaniają ku stwierdzeniu, iż możliwe jest manipulowanie poziomem cholesterolu w spożywanym mięsie poprzez odpowiednią modyfikację diety, przykładowo wzbogacając ją w odpowiednie oleje roślinne.

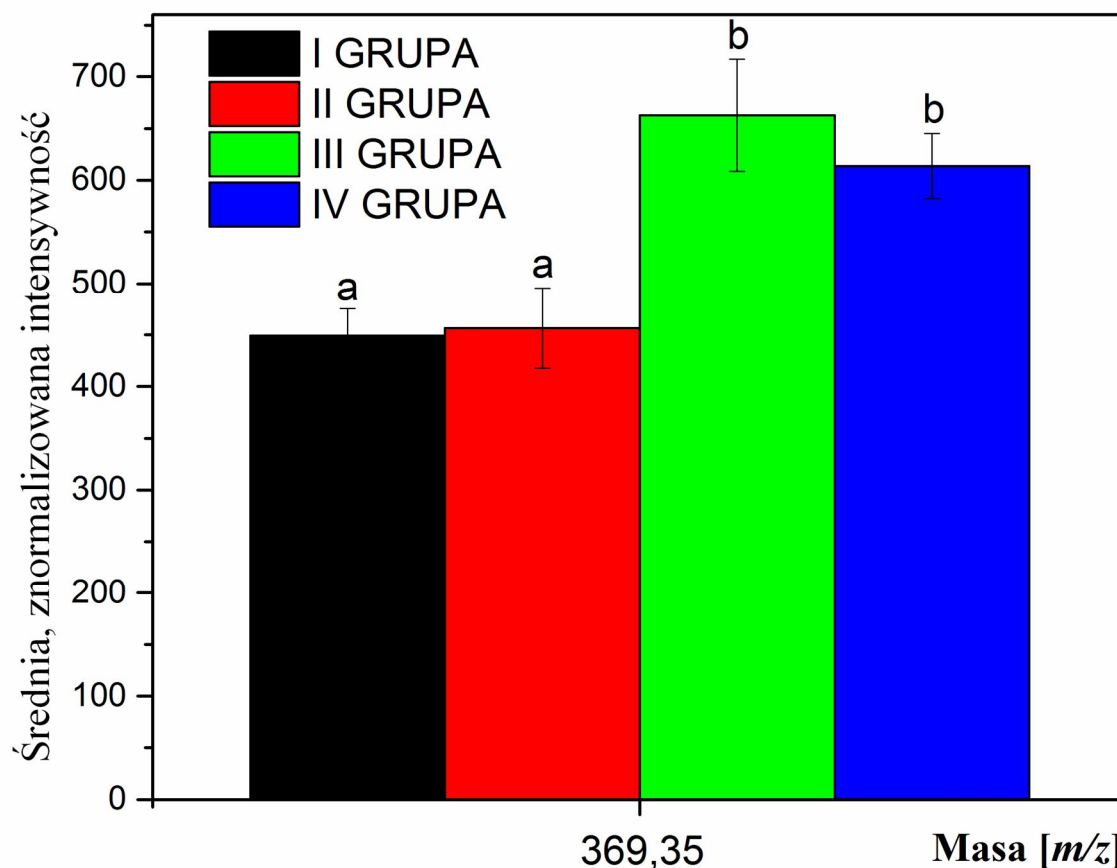
Wyniki odnoszące się do tłuszczu śródmięśniowego przedstawiono w **Tab. 15**.

Tab. 15. Analiza wariancji wybranych jonów charakterystycznych steroli w polaryzacji dodatniej dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_{1 \geq 2,65}$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Cholesterol [M+H-H ₂ O] ⁺	369,35	[C ₂₇ H ₄₅] ⁺	6,90
Cholesterol [M+H] ⁺	385,35	[C ₂₇ H ₄₆ O] ⁺	0,14

Analiza ANOVA pokazuje, że tylko dla jednego spośród dwóch charakterystycznych jonów steroli w polaryzacji dodatniej występuje istotna

statystycznie różnica pomiędzy grupami. Na **Rys. 41** zamieszczono histogram dla jednego z dwóch analizowanych jonów.



Rys. 41. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności dodatniego, charakterystycznego jonu cholesterolu dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych steroli) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Jak widać, istotnie niższe wartości intensywności jonu o masie 369,35 ($[C_{27}H_{45}]^+$), stwierdzono w grupie I i II w porównaniu do grupy żywieniowej III i IV, pomiędzy którymi różnice nie były istotne statystycznie.

Opisane wyżej obserwacje znajdują potwierdzenie w dotychczasowych badaniach, wskazujących na silną zależność pomiędzy źródłem tłuszczu w diecie, a poziomem cholesterolu w tkance mięśniowej kurcząt [299, 300]. Badania Grabowskiego i Kijowskiego [301] wskazują, że wahania zawartości cholesterolu w mięsie zwierząt rzeźnych są efektem wpływu zarówno czynników genetycznych, jak i środowiskowych – głównie żywieniowych. Również Barowicz [302] i Brisson [295] wykazali, że poziom cholesterolu w produktach zwierzęcych może być uzależniony od sposobu żywienia jak i od rodzaju tłuszczu w paszy. I tak, nasycone kwasy tłuszczowe wpływają na zwiększenie syntezy cholesterolu w wątrobie oraz wzrost jego stężenia w surowicy krwi, natomiast nienasycone kwasy tłuszczowe obniżają poziom cholesterolu w surowicy krwi. Również Barteczko i in. [271] analizując efektywność żywienia brojlerów lnem oleistym potwierdzają, iż dieta ma istotny wpływ na poziom cholesterolu. Autorzy wykazali, iż poziom

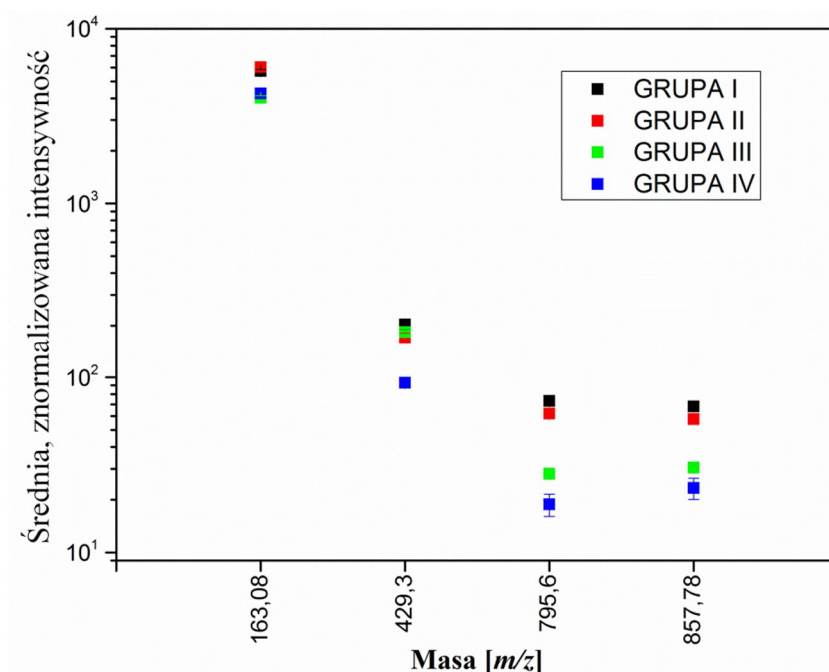
cholesterolu całkowitego w surowicy krwi brojlerów z grup otrzymujących w paszy dodatek lnu okazał się istotnie niższy w porównaniu z grupą kontrolną. Z drugiej strony, odmienne wyniki odnotowali Jung i in. [303], którzy analizując wpływ mieszaniny kwasów galusowego i linolowego dodawanych do diety podstawowej brojlerów nie odnotowali statystycznie istotnych różnic w poziomie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi w grupie suplementowanej mieszaniną kwasów w porównaniu do grupy kontrolnej.

Ponadto, wyniki wielu badań sugerują, że większy wpływ na obniżenie poziomu cholesterolu we krwi może mieć stosunek kwasów tłuszczowych z rodziny ω -6 do ω -3 niż ogólna zawartość niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych [272, 273]. Co więcej, na zawartość cholesterolu w tkankach ma wpływ nie tylko obecność nienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie, wzajemne proporcje kwasów tłuszczowych ω -6 do ω -3, ale również zawartość mikroelementów – głównie chromu i miedzi [302]. Nie można także zapominać, że cholesterol jest prekursorem hormonów steroidowych, hormonów płciowych i wraz z obniżeniem poziomu cholesterolu w organizmie pojawiają się problemy z rozrodem. Ponadto, cholesterol jest naturalnym i niezbędnym składnikiem strukturalnym błon komórkowych, prekursorem kwasów żółciowych, hormonów, a także witaminy D₃, a więc jest substancją niezbędną dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Warto także przypomnieć, zaznaczone we wstępie teoretycznym wiadomości, iż transportowany w osoczu krwi cholesterol związany jest w kompleks białkowo-lipidowy z lipoproteinami. Od typu tych polipeptydów zawierających w swym składzie wolny i zestrtyfikowany cholesterol zależy w jakie reakcje i szlaki będzie wchodził transportowany cholesterol, a przez to jaki efekt biologiczny będzie wywołany jego obecnością. Należy w tym miejscu nadmienić, iż wykorzystana technika nie umożliwia rozróżnienia opisanych dwóch frakcji cholesterolu, a jedynie daje informację o całkowitej zawartości tej cząsteczki biologicznej w badanej strukturze. A więc, na podstawie otrzymanych wyników nie jest możliwe rozważanie na temat efektu biologicznego zaobserwowanej zmiany w analizie porównawczej jonów charakterystycznych dla cholesterolu.

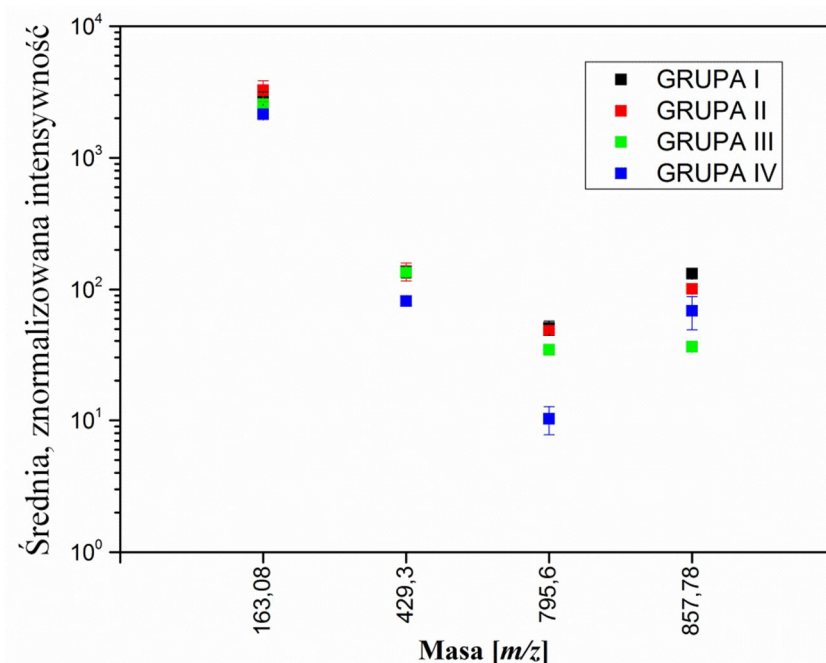
4.6. Prenole

Witamina E, będąca, jednym z najważniejszych przedstawicieli grupy prenolowej, jest obecna w olejach roślinnych tokoferol (α -tokoferol). Cząsteczka ta jest silnym przeciwutleniaczem, chroniącym białka i tłuszcze komórek przed utlenianiem, promuje wydalanie sodu z moczem. Poza główną funkcją transportową tłuszczy, oleje roślinne same w sobie posiadają w swoim składzie między innymi właśnie witaminę E [304]. Na **Rys. 42, 43** zamieszczono poglądowe wykresy zawierające zestawienie wszystkich charakterystycznych jonów prenoli w polaryzacji ujemnej, odpowiednio dla włókien mięśniowych oraz tłuszczu śródmięśniowego.



Rys. 42. Poglądowe zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików prenoli w polaryzacji ujemnej dla włókien mięśniowych.

Analiza powyższego rysunku wykazała zróżnicowanie grup ze względu na wartości średnich, znormalizowanych intensywności. W przypadku każdej z zaprezentowanych mas najmniejsza intensywność została wyznaczona w grupie IV, referencyjnej. Szczegółowa analiza z uwzględnieniem testów statystycznych została przedstawiona w **Tab. 16** oraz na **Rys. 53**.



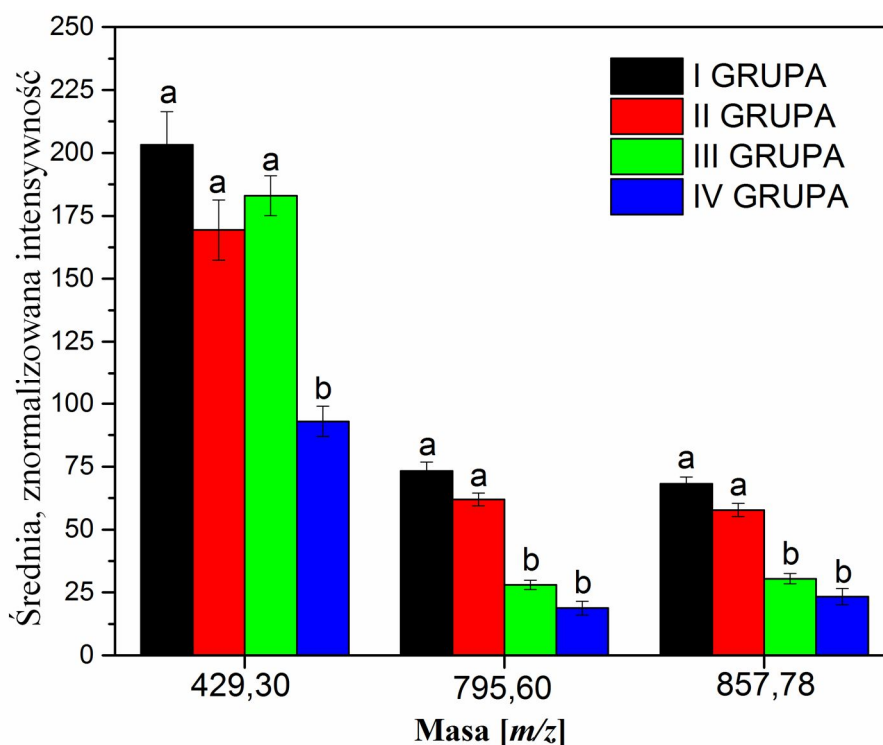
Rys. 43. Poglądowe zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności charakterystycznych pików prenoli w polaryzacji ujemnej dla tłuszczu śródmięśniowego.

Odnosząc się do wyników prezentowanych na **Rys. 43** i tu można dostrzec, iż w trzech z czterech przypadków najmniejsza intensywność została zaobserwowana w grupie IV. W celu bardziej szczegółowego określenia tendencji obserwowanych na **Rys. 43** poniżej przedstawiono szczegółową analizę statystyczną wyników.

Tab. 16. Analiza wariancji wybranych jonów charakterystycznych prenoli w polaryzacji ujemnej dla włókien mięśniowych. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_{1 \geq 2,65}$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
α -tokoferol [M-H] ⁻	429,30	[C ₂₉ H ₄₉ O ₂] ⁻	18,71
Koenzym Q9 [M-H] ⁻	795,60	[C ₅₄ H ₈₃ O ₄] ⁻	68,50
Koenzym Q9 [M-H] ⁻	857,78	[C ₅₈ H ₉₇ O ₄] ⁻	49,30

W analizie zmian poziomów lipidów, które zawierają w sobie witaminę E (α -tokoferol) oraz koenzym Q9, uwzględniono wyniki otrzymane w polaryzacji ujemnej dla trzech charakterystycznych jonów. Pierwszy, o m/z 429,30, odpowiada jonowi α -tokoferolu ([M-H]⁻, C₂₉H₈₃O₄), drugi i trzeci jon to dwie formy koenzymu Q9 o masie odpowiednio 795,6 (C₅₄H₈₃O₄) oraz m/z 857,8 (C₅₈H₉₇O₄). W celu lepszego zobrazowania istniejących różnic między grupami, na **Rys. 44** zamieszczono histogram zestawiający wartości intensywności dla tych jonów. Histogram ukazuje wpływ określonej modyfikacji diety brojlerów na zawartość grupy lipidowej – prenoli.



Rys. 44. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, charakterystycznych jonów prenoli w przypadku włókien mięśniowych. Indeksy a, b przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych prenoli) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

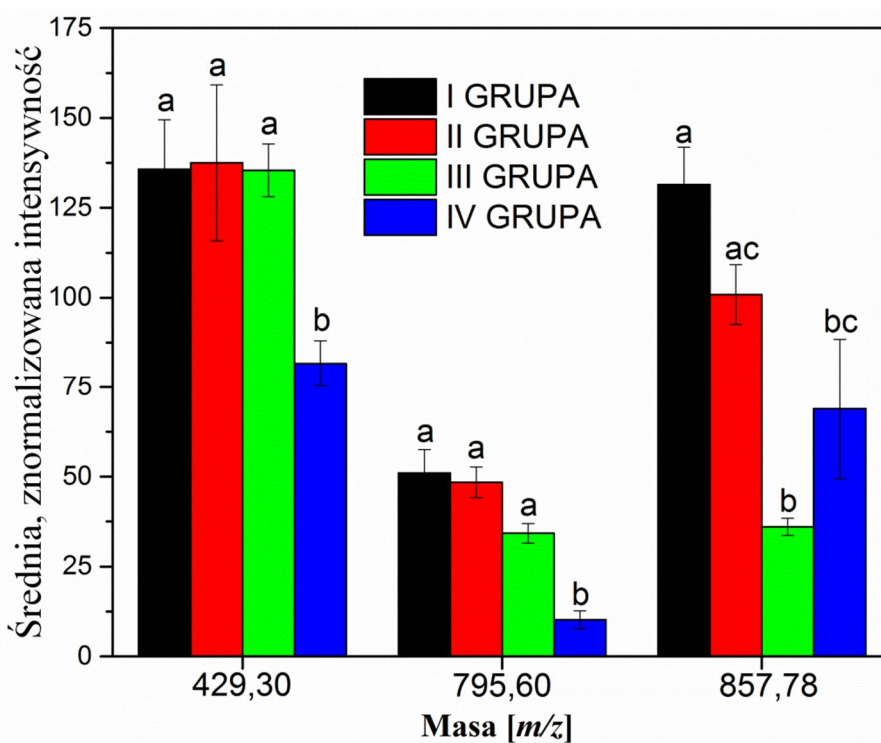
W odniesieniu do włókien mięśniowych, istotnie niższy poziom witaminy E (m/z 429,3) zaobserwowano dla tkanek z grupy IV, w porównaniu do pozostałych grup żywieniowych, między którymi nie wykryto statystycznie istotnych różnic. Z kolei, próbki tkanek mięśni pobrane od zwierząt z grupy III i IV charakteryzowały się istotnie niższą intensywnością obydwu form koenzymu Q9 (m/z 795,60 oraz m/z 857,78) w stosunku do grupy I i II.

Analogiczną analizę statystyczną wykonano dla tłuszczu śródmięśniowego. Jej wyniki prezentuje **Tab. 17** i **Rys. 45**.

Tab. 17. Analiza wariancji wybranych jonów charakterystycznych dla prenoli w polaryzacji ujemnej dla obszarów tłuszczu śródmięśniowego. Zgodnie z analizą wariancji dla $F_1 \geq 2,65$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
α - tokoferol [M-H] ⁻	429,30	[C ₂₉ H ₄₉ O ₂] ⁻	6,67
Koenzym Q9 [M-H] ⁻	795,60	[C ₅₄ H ₈₃ O ₄] ⁻	15,39
Koenzym Q9 [M-H] ⁻	857,78	[C ₅₈ H ₉₇ O ₄] ⁻	8,42

Podobnie jak w przypadku włókien mięśniowych, wyniki dotyczące tłuszczu śródmięśniowego świadczą o istotnej statystycznej różnicy między wartościami intensywności dla poszczególnych grup eksperymentalnych. Dodatkowo, wartości statystyki F_1 są mniejsze w stosunku do wartości wyliczonych dla włókien mięśniowych. Wykres kolumnowy obrazujący różnice między poszczególnymi grupami przedstawiono poniżej.



Rys. 45. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności ujemnych, charakterystycznych jonów prenoli dla tłuszczu śródmięśniowego. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych prenoli) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Udowadnia on, iż w obszarach tłuszczu śródmięśniowego, wartości średnich intensywności dla jonu tokoferolu (m/z 429,3) oraz koenzymu Q (m/z 795,6) dla pierwszych trzech grup, w których zastosowano oleje roślinne, są na tym samym poziomie i nie różnią się istotnie statystycznie. Zmianę można zanotować jedynie w przypadku próbek z grupy IV (łój wołowy), gdzie wartość średniej intensywności jest istotnie niższa w porównaniu od pozostałych grup. Z kolei, dla jonu koenzymu Q9 o masie 857,78 wyższa intensywność charakteryzuje grupę I w stosunku do grupy III i IV, między którymi różnice były istotne statystycznie. Grupa, w której zastosowano olej lniany (grupa II) również cechowała się istotnie wyższą intensywnością omawianego jonu w porównaniu z grupą III, w przeciwieństwie do grupy IV, gdzie różnice okazały się nieistotne statystycznie.

Wyższy udział jonu tokoferolu, a także obu jonów koenzymu Q9 zarówno w tkance mięśniowej jak i tłuszczu śródmięśniowym, wykazane w niniejszej pracy w grupach suplementowanych olejami roślinnymi, a w szczególności w grupie I oraz II gdzie zwierzęta otrzymywały dodatek odpowiednio oleju sojowego i oleju lnianego, w porównaniu z grupą IV suplementowaną łojem wołowym, może mieć związek z faktem, że zastosowane oleje roślinne zawierają w swoim składzie witaminę E. Jak wskazują badania Rosołowska-Huszcz [256], olej sojowy zawiera 10 mg/100g witaminy E, natomiast olej lniany 10-cio krotnie mniej, gdyż jedynie 1 mg/100g produktu.

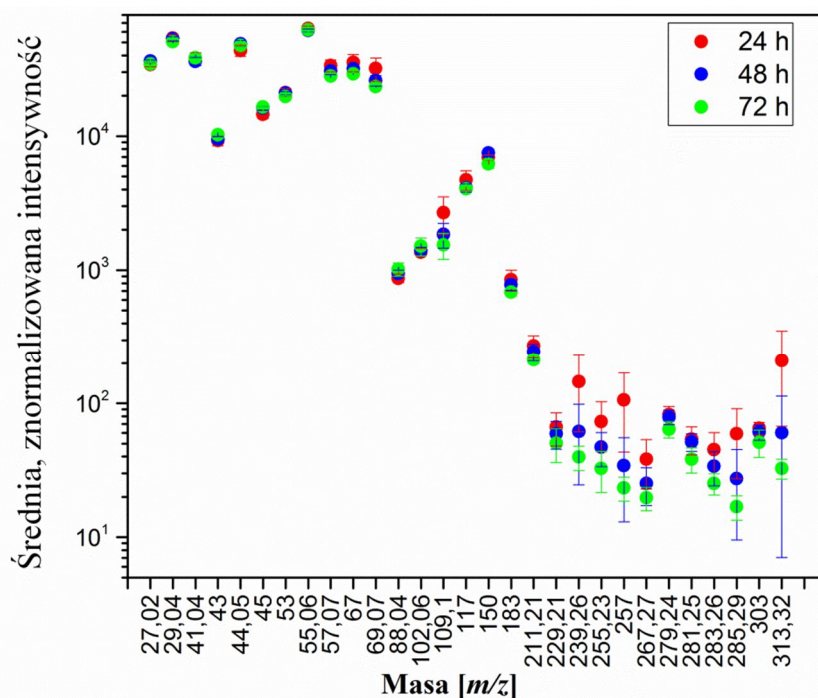
Jak już wcześniej wspomniano, organizm człowieka nie dysponuje odpowiednimi szlakami metabolicznymi zapewniającymi syntezę długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w przypadku ich braku w diecie. Prekursorami w tych procesach syntezy są kwasy linolowy i α -linolenowy. W przypadku braku syntezy dla właściwego przyswajania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych niezbędna jest witamina E (α -tokoferol), jako naturalny przeciwutleniacz. Poziom koenzymu Q9 ma również istotne znaczenie, gdyż jako ważny przeciwutleniacz liofilowy, zapobiega generacji wolnych rodników, a także oksydacyjnym modyfikacjom białek, lipidów i DNA. Koenzym Q9 odgrywa także istotną rolę w regeneracji silnego przeciwutleniacza liofilowego – witaminy E (α -tokoferolu) [305]. Stąd też, wykazane w niniejszej pracy wysokie poziomy intensywności jonów α -tokoferolu i koenzymu Q9 w grupie I oraz II mogą mieć pozytywny wpływ na jakość mięsa drobiowego w aspekcie żywności funkcjonalnej, gdyż jako naturalne przeciwutleniacze, neutralizując wolne rodniki, zapobiegają jełczeniu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [306, 307]. Co oczywiste hamują utlenianie cholesterolu i powstawanie oksysteroli w mięsie [308, 309].

5. Wpływ przechowywania chłodniczego na profile lipidowe

5.1. Kwasy tłuszczowe

Pierwsza analizowana klasa lipidowa obejmuje kwasy tłuszczowe. Istnieje wiele prac wskazujących na zmiany zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w mięsie drobiowym przechowywanym w warunkach chłodniczych. Ten typ mięsa jest istotnie bardziej czuły na procesy peroksydacji w porównaniu z innymi rodzajami mięs [310]. Wynika to z faktu, iż niemal 70% lipidów w mięsie drobiowym to nienasycone kwasy tłuszczowe, włączając to niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe, z których ok. 16g/100g tłuszczu stanowi kwas linolowy oraz 3g/100g tłuszczu stanowi kwas α -linolenowy [311]. W mięsie drobiowym występują mono- i polienowe kwasy tłuszczowe, a zważywszy na wspomnianą w części teoretycznej zależność, iż o szybkości utleniania lipidów decyduje ilość podwójnych wiązań w kwasach tłuszczowych, proces utleniania lipidów jest wysoce prawdopodobny. Utlenianie lipidów mięsa jest wyjątkowo złożonym procesem, co wiąże się m. in. z dużą wrażliwością produktów utleniania na rozkład i wchodzenie w reakcje z innymi składnikami mięsa, a także ze złożonym wpływem katalizatorów i naturalnych przeciwutleniaczy mięsa. Zmiany wywołane w lipidach w trakcie utleniania wynikają z rodnikowej reakcji autooksydacyjnej, w przebiegu której można wyróżnić: etap inicjacji, propagacji i terminacji łańcucha [312, 313]. Jednym z ważniejszych czynników wpływających na tempo utleniania lipidów jest temperatura. Jak wskazują badania Pikula oraz Kanner [141, 314], przechowywanie mięsa w warunkach chłodniczych umożliwia wydłużenie okresu indukcyjnego, co jednak nie oznacza, że procesy utleniania lipidów w mięsie nie zachodzą.

Rozpoczynając analizę zidentyfikowano wszystkie, charakterystyczne jony dla tej grupy lipidowej. Bazą identyfikacji były dane literaturowe oraz własna biblioteka oparta na wynikach uzyskanych we wcześniejszych badaniach układów lipidowych. Opis wszystkich charakterystycznych jonów rejestrowanych w polaryzacji dodatniej znajduje się w aneksie.



Rys. 46. Zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów kwasów tłuszczowych.

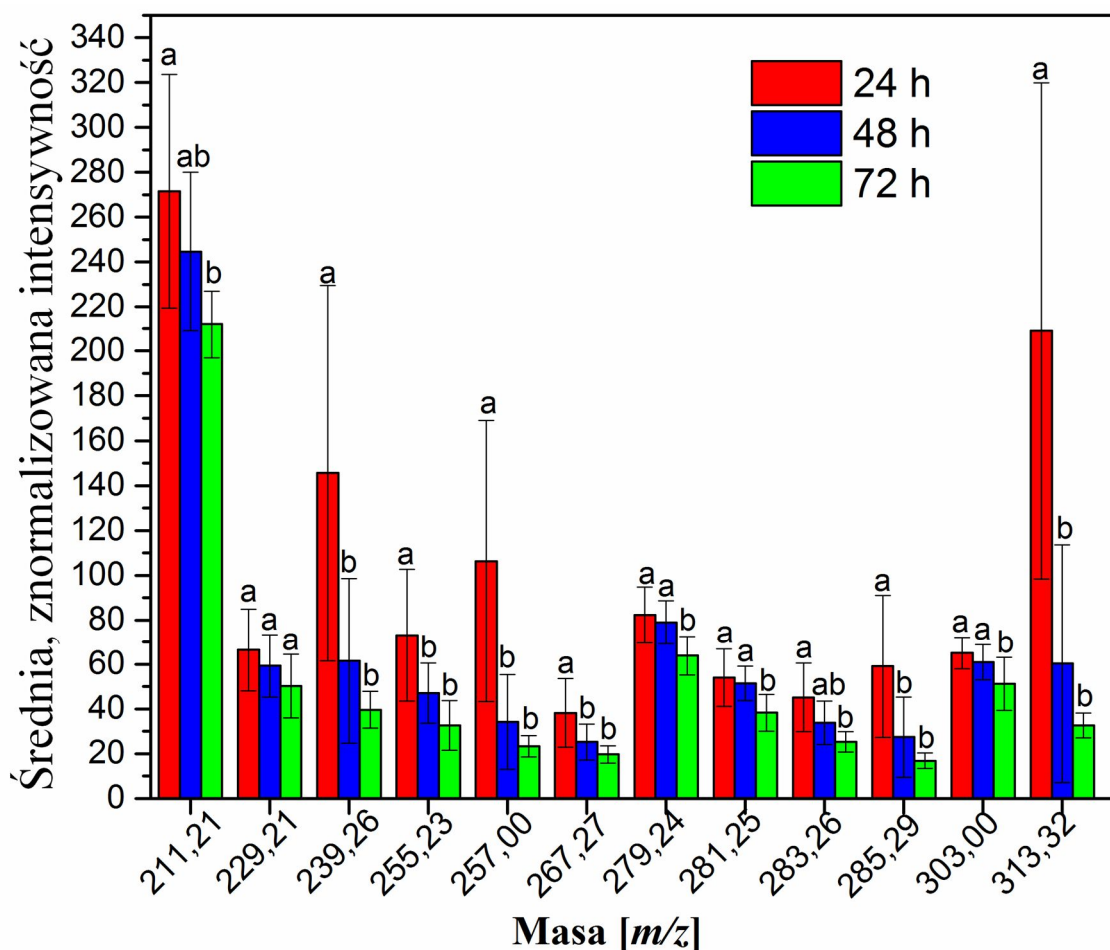
Rys. 46 prezentuje średnie znormalizowane wartości intensywności, dla wszystkich trzech grup doświadczalnych. Wyznaczono je dla mas molekuł zidentyfikowanych jako jony charakterystyczne kwasów tłuszczowych, obserwowanych w polaryzacji dodatniej. Widoczne jest zróżnicowanie międzygrupowe dla mas większych od m/z 229,21, dla których najmniejsze intensywności, zgodnie z przewidywaniami, przypisane są do grupy, w której tkanki były najdłużej przechowywane w warunkach chłodniczych. Widoczne jest, iż dla większości mas największe poziomy intensywności uzyskano dla próbek pobranych dobę po uboju. **Tab. 18** zestawia wyniki analizy ANOVA oraz testu Tukey'a uzyskanych danych eksperymentalnych.

Tab. 18. Analiza wariancji intensywności charakterystycznych jonów kwasów tłuszczowych w polaryzacji dodatniej. Zgodnie z analizą wariancji dla $F > 3,01$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha = 0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Fragment kwasu mirystynowego	211,21	$C_{14}H_{27}O^+$	6,98
Jon molekularny kwasu mirystynowego	229,21	$C_{14}H_{29}O_2^+$	2,95
Fragment kwasu palmitynowego	239,26	$C_{16}H_{31}O^+$	12,15
Fragment kwasu palmitynowego (16:0)	255,23	$C_{16}H_{31}O_2^+$	11,81
Jon molekularny kwasu palmitynowego	257,00	$C_{16}H_{33}O_2^+$	15,08
Fragment kwasu stearynowego	267,27	$C_{18}H_{35}O^+$	9,59

Jon molekularny kwasu linolowego (18:2)	279,24	$C_{18}H_{31}O_2^+$	9,60
Jon molekularny kwasu oleinowego (18:1)	281,25	$C_{18}H_{33}O_2^+$	8,06
Fragment kwasu stearynowego (18:0)	283,26	$C_{18}H_{35}O_2^+$	9,37
Jon molekularny kwasu stearynowego	285,29	$C_{18}H_{37}O_2^+$	11,89
Fragment kwasu arachidonowego	303,00	$C_{20}H_{31}O_2^+$	6,52
Jon molekularny kwasu arachidonowego	313,32	$C_{20}H_{41}O_2^+$	12,93

Opierając się na wynikach zamieszczonych w tabeli można zauważyć, iż dla wszystkich charakterystycznych jonów kwasów tłuszczowych analiza wariancji ANOVA wykazała znaczące statystycznie różnice. Analiza zmierzonych zmian pokazana jest na **Rys. 47**.



Rys. 47. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów wybranych kwasów tłuszczowych. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych kwasów tłuszczowych) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Na podstawie rysunku można wyciągnąć kilka wniosków. Praktycznie dla wszystkich analizowanych jonów, za wyjątkiem jonu o masie m/z 229,21, odnotowano istotny wpływ przechowywania chłodniczego mięsa na wartości intensywności analizowanych jonów molekularnych. Spośród omawianych jonów najbardziej stabilny okazał się jon macierzysty kwasu mirystynowego (m/z 229,21), w przypadku którego nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w wartościach intensywności w trzech analizowanych okresach czasowych. Można sądzić, iż zawartość tego kwasu w trakcie przechowywania chłodniczego mięsa w temperaturze 4°C nie zmienia się. Otrzymany wynik może stanowić potwierdzenie zależności mówiącej o szybkości utleniania lipidów w funkcji ilości wiązań nienasyconych. I tak, Coritans i in. [315] wykazali, iż zwiększenie udziału wielonienasyconych, niezbędnych kwasów tłuszczowych w diecie broilerów zwiększa podatność mięsa drobiowego na oksydacyjne jełczenie proporcjonalnie do zastosowanej ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wiele prac wskazuje, iż wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny ω -3 charakteryzują się wyższym stopniem reaktywności i podatności na utlenianie niż lipidy składające się z innych frakcji [142, 316]. Niestety, ze względu na niskie intensywności charakterystycznych pików kwasu α -linolenowego, niemożliwe było określenie czasowych zmian w zawartości tego kwasu w badanych próbkach.

W przypadku pozostałych jedenastu wyróżnionych jonów, w charakterze zaobserwowanych zmian można wyróżnić trzy rodzaje. Po pierwsze, dla fragmentu kwasu mirystynowego (m/z 211,21) oraz jonu fragmentacyjnego kwasu stearynowego (m/z 283,26), a więc dla fragmentów kwasów z grupy nasyconych, istotny spadek wartości intensywności, w stosunku do wartości intensywności odnotowanych po 24 h od uboju (grupa I), stwierdzono po 72 h przechowywania mięsa w warunkach chłodniczych (grupa III). Z drugiej strony, brak istotnych różnic w wartości intensywności tych jonów pomiędzy grupą II a grupami I oraz III wskazuje, że przechowywanie chłodnicze mięsa przez 48 h nie wpływa na poziomy zawartości obu analizowanych kwasów. Kwasy te należą do nasyconych, co może tłumaczyć ich stabilność w drugiej dobie przechowywania.

Po drugie, sytuacja wygląda odmiennie dla trzech jonów charakterystycznych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych: jonu molekularnego kwasu linolowego o masie m/z 279,24, jonu molekularnego kwasu oleinowego (m/z 281,25) oraz jonu fragmentacyjnego kwasu arachidonowego o masie m/z 303, dla których nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w wartościach średnich pomiędzy I oraz II grupą doświadczalną, natomiast po 72 h (grupa III) występuje istotny statystycznie spadek wartości intensywności omawianych jonów. Można więc przypuszczać, że największy spadek w zawartości dla wyżej wymienionych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, spowodowany reakcjami utleniania, nastąpił w trzeciej dobie po uboju.

Po trzecie, ostatnia najliczniejsza grupa charakterystycznych jonów, obejmująca w głównej mierze jony charakterystyczne dla nasyconych kwasów tłuszczowych, za wyjątkiem masy m/z 313,32 charakterystycznej dla fragmentu

kwasy arachidonowe, odznacza się istotnym statystycznie spadkiem wartości intensywności w grupie II w stosunku do grupy I. Z kolei, dalsze przechowywanie mięsa w warunkach chłodniczych (grupa III) nie miało istotnego wpływu na wartości intensywności omawianych jonów w stosunku do grupy II. Taka sytuacja ma miejsce dla mas m/z 239,26 (fragment kwasu palmitynowego), m/z 255,23 (fragment kwasu palmitynowego), m/z 257,00 (jon kwasu palmitynowego), m/z 267,27 (fragment kwasu stearynowego) oraz m/z 285,29 (jon kwasu stearynowego).

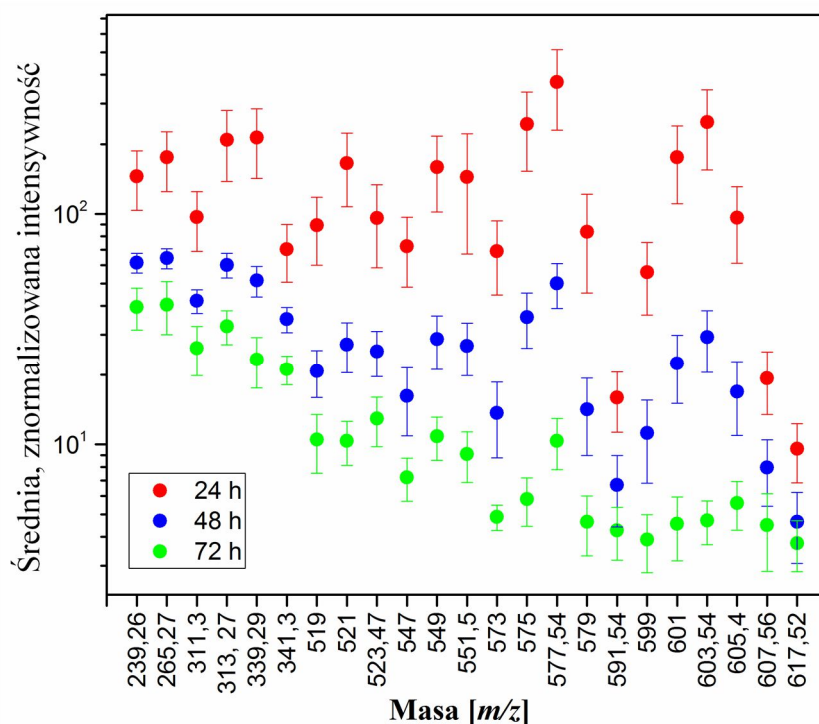
Wiadomo, iż świeże mięso w ciągu kilku dni od wystąpienia stężenia poubojowego charakteryzuje się wystarczającą stabilnością wobec procesów oksydacyjnych ze względu na występowanie naturalnych antyoksydantów, takich jak dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH), witamin C i E oraz oksydoreduktaz, będących enzymami antyoksydacyjnymi [307]. Zawartość tych składników zmniejsza się wraz z czasem przechowywania, prowadząc ostatecznie do powstawania szkodliwych dla zdrowia produktów utleniania [310]. Otrzymane wyniki, wykazujące iż zawartość kwasów tłuszczowych zmniejsza się w trakcie przechowywania chłodniczego, potwierdzają doniesienia literaturowe [315-318].

Jak ustalono na podstawie dotychczas przeprowadzanych badań, szybkość i kierunek utleniania lipidów mięsa zależy od bardzo wielu czynników, takich jak skład chemiczny, stopień uwodnienia, zawartości naturalnych antyoksydantów, procesów i operacji technologicznych, ilości uszkodzeń tkankowych oraz, co istotne, warunków przechowywania [318, 319]. Jętczenie oksydacyjne związane z utlenianiem lipidów inicjuje proces psucia mięsa oraz produktów mięsnych i związane jest z uszkodzeniami struktur organicznych w organizmach żywych [310, 320]. Skutek utleniania lipidów to zmniejszenie walorów smakowych i pogorszenie zapachu mięsa. Towarzyszą im zmiany w teksturze i barwie mięsa [317].

Wraz z poszerzeniem wiedzy na temat pozytywnego działania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na organizmy żywe, można zauważyć trend zwiększania wyżej wymienionych składników w toku produkcyjnym żywności mięsnej, poprzez stosowanie określonych dodatków do paszy. Należy jednak mieć na uwadze, iż takie zabiegi obarczone są wzrostem podatności tych produktów żywnościowych na procesy utleniania [321, 322].

5.2. Glicerolipidy

Kolejna grupa, dla której przeprowadzono analizę zmian w profilach lipidowych w mięśniach piersiowych kurcząt brojlerów, zachodzących w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C przez okres 72 h, to glicerolipidy. Na **Rys. 48** zamieszczono zebrane rezultaty badań nad tą grupą lipidową. Dla przypomnienia, lipidy należące do tej grupy związków są odpowiedzialne za usztywnianie powierzchni błon komórkowych. Są również głównymi składnikami tłuszczu zapasowego.



Rys. 48. Zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów glicerolipidów.

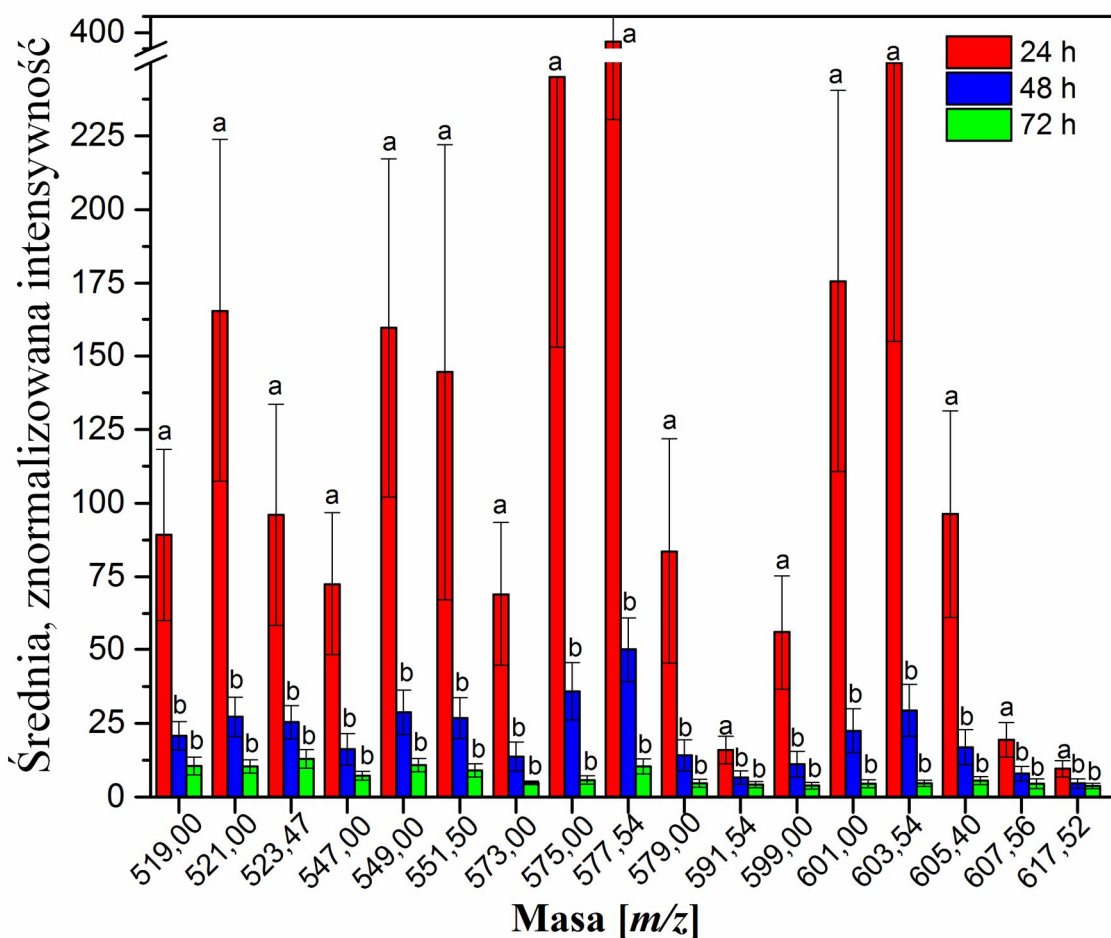
Rysunek prezentuje wartości znormalizowanych intensywności dla wszystkich charakterystycznych jonów tej grupy lipidowej w polaryzacji dodatniej. Z przedstawionych danych wyraźnie widać różnicę między trzema analizowanymi okresami przechowywania mięsa dla wszystkich wyróżnionych, charakterystycznych jonów. I tak, największa wartość średniej intensywności przypada dla grupy I, a więc dla której próbki pobrano po 24 h, mniejsze intensywności zaobserwowano w grupie II, zaś z najmniejszymi wartościami intensywności plasuje się grupa III, dla której próbki były najdłużej przechowywane w warunkach chłodniczych. **Tab. 19** prezentuje wyniki analizy wariancji ANOVA oraz testu Tukey'a dla wszystkich jonów glicerolipidów.

Tab. 19. Analiza wariancji intensywności charakterystycznych jonów glicerolipidów w polaryzacji dodatniej. Zgodnie z analizą wariancji dla $F > 3,01$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha = 0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Fragment diacyloglicerolu DAG (30:2), [M+H-OH] ⁺	519,00	C ₃₃ H ₅₉ O ₄ ⁺	15,39
Fragment diacyloglicerolu DAG (30:1), [M+H-OH] ⁺	521,00	C ₃₃ H ₆₁ O ₄ ⁺	15,43
Fragment diacyloglicerolu DAG (30:0), [M+H-OH] ⁺	523,47	C ₃₃ H ₆₃ O ₄ ⁺	9,94
Fragment diacyloglicerolu DAG (32:2), [M+H-OH] ⁺	547,00	C ₃₅ H ₆₃ O ₄ ⁺	13,09
Fragment diacyloglicerolu DAG (32:1), [M+H-OH] ⁺	549,00	C ₃₅ H ₆₅ O ₄ ⁺	13,24

Fragment diacyloglicerolu DAG (32:0), [M+H-OH] ⁺	551,50	C ₃₅ H ₆₇ O ₄ ⁺	6,81
Fragment diacyloglicerolu DAG (34:3), [M+H-OH] ⁺	573,00	C ₃₇ H ₆₅ O ₄ ⁺	13,40
Fragment diacyloglicerolu DAG (34:2), [M+H-OH] ⁺	575,00	C ₃₇ H ₆₇ O ₄ ⁺	13,16
Fragment diacyloglicerolu DAG (34:1), [M+H-OH] ⁺	577,54	C ₃₇ H ₆₉ O ₄ ⁺	13,68
Fragment diacyloglicerolu DAG (34:0) [M+H-OH] ⁺ oraz triacyloglicerolu TAG(52:0)	579,00	C ₃₇ H ₇₁ O ₄ ⁺	9,34
Fragment diacyloglicerolu DAG (32:0)	591,54	C ₃₅ H ₆₈ O ₅ Na ⁺	10,92
Fragment diacyloglicerolu DAG (36:4), [M+H-OH] ⁺	599,00	C ₃₉ H ₆₇ O ₄ ⁺	13,99
Fragment diacyloglicerolu DAG (36:3), [M+H-OH] ⁺	601,00	C ₃₉ H ₆₉ O ₄ ⁺	14,73
Fragment diacyloglicerolu DAG (36:2), [M+H-OH] ⁺	603,54	C ₃₉ H ₇₁ O ₄ ⁺	14,32
Fragment diacyloglicerolu DAG (36:1), [M+H-OH] ⁺	605,40	C ₃₉ H ₇₃ O ₄ ⁺	13,02
Fragment diacyloglicerolu DAG (36:0), [M+H-OH] ⁺ oraz triacyloglicerolu TAG(52:0)	607,56	C ₃₉ H ₇₅ O ₄ ⁺	10,97
Fragment diacyloglicerolu DAG (34:1), [M+H-OH] ⁺	617,52	C ₃₇ H ₇₀ O ₅ Na ⁺	8,77

W tabeli można zauważyć charakterystyczne, wspólne cechy dla wszystkich jonów. Pierwsza z nich dotyczy statystyki *F*, która dla wszystkich mas są na podobnym poziomie. Może to świadczyć o wpływie czasu przechowywania mięsa na zawartość poszczególnych związków w tej klasie lipidów. Obserwowane różnice pomiędzy wartościami intensywności dla wybranych jonów w sposób obrazowy przedstawia **Rys. 49**.



Rys. 49. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności dla dodatnich, charakterystycznych jonów wybranych glicerolipidów. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych glicerolipidów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

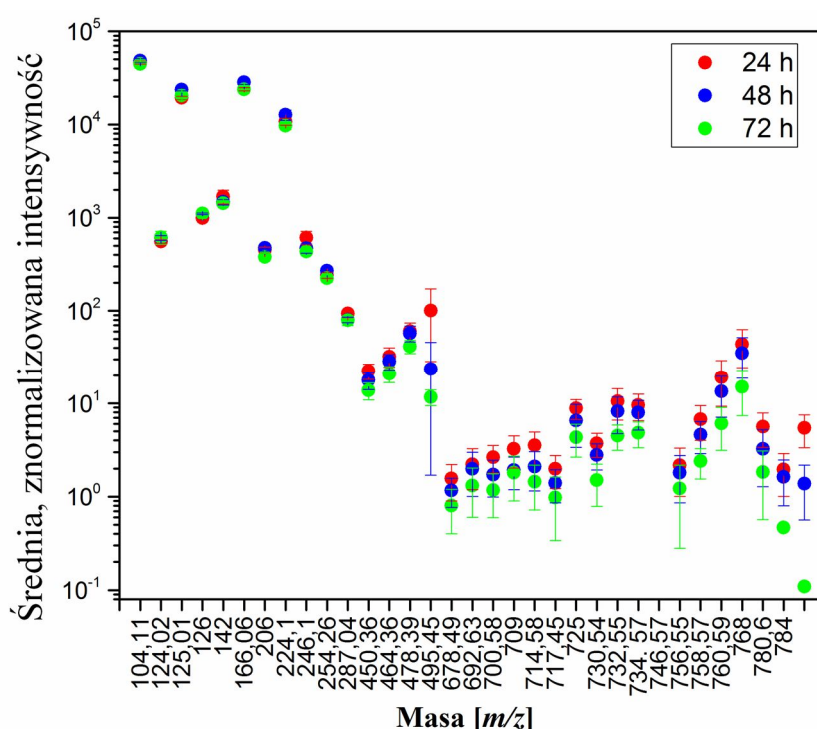
Z powyższego wykresu jednoznacznie widać, iż odnotowano w przybliżeniu takie same zmiany dla wszystkich zanalizowanych jonów. Mianowicie, wartości intensywności dla grupy próbek I, dla której próbki mięśni pobrano najwcześniej, a więc po 24 h przechowywania chłodniczego, są istotnie wyższe od pozostałych dwóch grup próbek, pomiędzy którymi różnice okazały się nieistotne statystycznie. Oznacza to, iż największe zmiany w zawartości lipidów należących do tej klasy lipidów zachodzą między pierwszą a drugą dobą przechowywania chłodniczego. Tym samym pokazują, że już początkowy okres chłodniczego przechowywania mięsa jest istotnym czynnikiem warunkującym stabilność lipidów.

Wcześniejsze badania dowodzą, że o stabilności lipidów decydują wszystkie te czynniki, które wpływają na reakcje utleniania, między innymi wspomniany już skład i struktura kwasów tłuszczowych, struktura cząsteczek triacylogliceroli, a także ilość i jakość substancji towarzyszących triacyloglicerolom - niepełnych acylogliceroli, takich jak monoacyloglicerole oraz dicyloglicerole [323]. Według Małeckiej [324] obie frakcje niepełnych acylogliceroli mogą przyczyniać się do obniżenia odporności na utlenianie produktów żywnościowych. Ze względu na fakt, iż w literaturze jest niewiele informacji na temat zmiany zawartości

diacyloglicerolów w mięsie drobiowych przechowywanym w warunkach chłodniczych, wyniki otrzymane metodą TOF-SIMS dla tej grupy lipidowej są tym bardziej wartościowe i dają podstawę do dalszych badań.

5.3. Glicerofosfolipidy

Wyodrębniona spośród glicerolipidów, grupa lipidowa glicerofosfolipidów, jest przedmiotem analizy w tym podrozdziale. Jest to grupa o bogatym zasobie związków różniących się strukturą i właściwościami. Dla wszystkich mas, zidentyfikowanych jako charakterystyczne dla tej grupy lipidowej, wykonano histogram (**Rys. 50**) ilustrujący zmiany w wartościach średnich intensywności, które powstały na skutek przechowywania mięśni piersiowych kurcząt brojlerów w warunkach chłodniczych przez określony interwał czasowy.



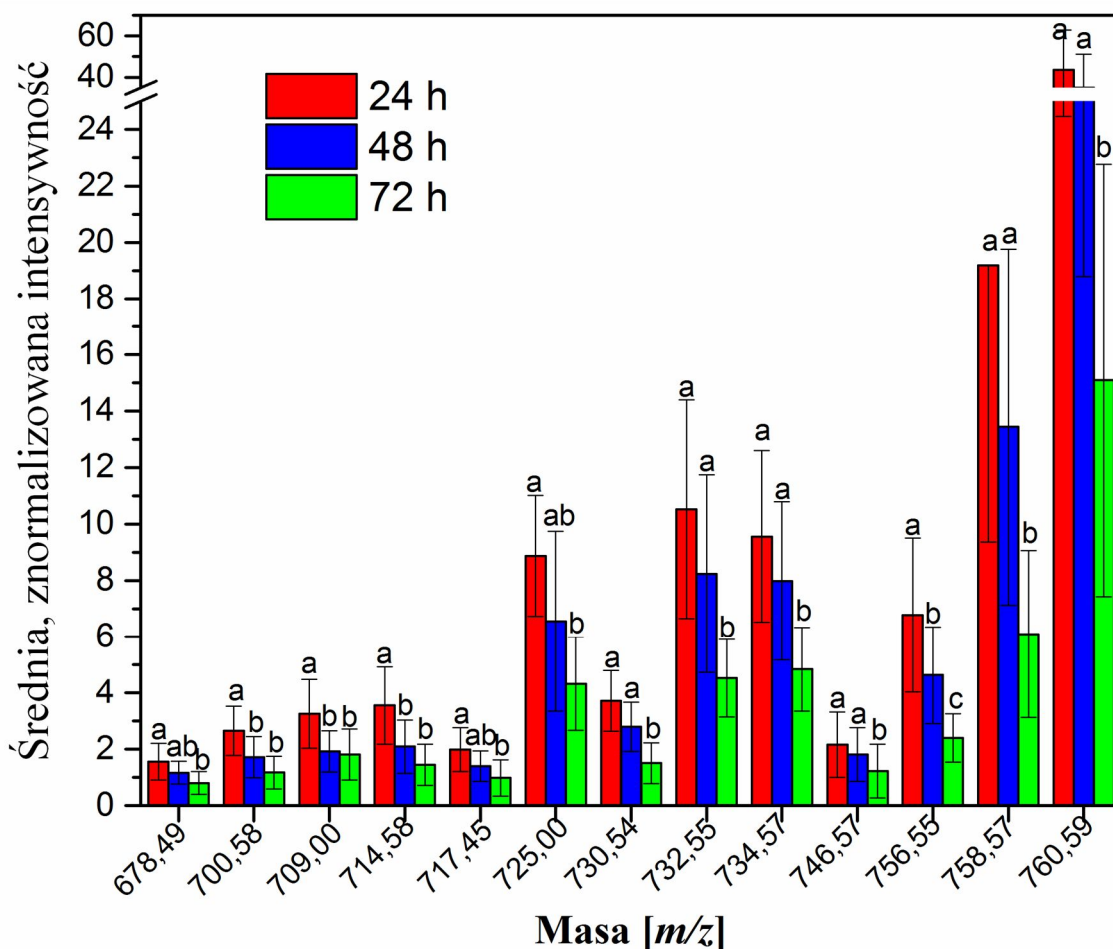
Rys. 50. Zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów glicerofosfolipidów.

Na rysunku widoczne są wyniki przeprowadzonych pomiarów dla 34 mas charakterystycznych dla glicerofosfolipidów w polaryzacji dodatniej. Pomijając masy najmniejsze (do m/z 254,26), które mogą być fragmentami również innych związków, a przez to mogą wprowadzać błędy w interpretacji wyników, widać iż najmniejsze wartości intensywności przypisane są grupie III. Wynik ten zgadza się z wcześniejszymi przewidywaniami, mówiącymi iż po 72 h przechowywania próbek mięśni piersiowych brojlerów w warunkach chłodniczych zawartość lipidów będzie najmniejsza. W celu dokładniejszej analizy w **Tab. 20** zamieszczono wyniki przeprowadzonej analizy wariancji ANOVA oraz testu Tukey'a. Analiza została przeprowadzona dla jonów o masach większych niż 495,45 amu.

Tab. 20. Analiza wariancji intensywności jonów charakterystycznych glicerofosfolipidów w polaryzacji dodatniej. Zgodnie z analizą wariancji dla $F > 3,01$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha=0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Fragment fosfatydylocholiny PC 28:0	678,49	$C_{36}H_{73}NO_8P^+$	6,30
Fragment fosfatydyloetanolaminy PE32:0	692,63	$C_{37}H_{75}NO_8P^+$	2,87
Fragment fosfatydylocholiny PC 28:0	700,58	$C_{36}H_{72}NO_8PNa^+$	11,38
Fragment glicerofosfocholiny (16:0e/18:1) [M+Na-TMA] ⁺	709,00	$C_{39}H_{75}O_7PNa^+$	7,47
Fragment fosfatydyloetanolaminy PE32:0	714,58	$C_{37}H_{74}NO_8PNa^+$	11,53
Fragment fosfatydyloinozytolu PI34:2	717,45	$C_{37}H_{68}PO_8Na_2^+$	6,49
Fragment glicerofosfocholiny (16:0e/18:1) [M+Na-TMA] ⁺	725,00	$C_{39}H_{75}O_7PK^+$	9,71
Fragment fosfatydyloetanolaminy PE32:0	730,54	$C_{37}H_{74}NO_8PK^+$	16,68
Fragment glicerofosfocholiny GPCho(32:1) [M+H] ⁺	732,55	$C_{40}H_{79}NO_8P^+$	10,36
Jon molekularny fosfatydylocholiny PC32:0 [M+H] ⁺	734,57	$C_{40}H_{81}NO_8P^+$	9,87
Jon molekularny glicerofosfoetanolaminy GPETHn(36:1) [M+H] ⁺	746,57	$C_{41}H_{81}NO_8P^+$	9,32
Fragment fosfatydyloetanolaminy PE34:1	756,55	$C_{39}H_{76}NO_8PK^+$	14,05
Jon molekularny glicerofosfocholiny PC34:2 [M+H] ⁺	758,57	$C_{42}H_{81}NO_8P^+$	9,78
Jon molekularny fosfatydylocholiny PC34:1 [M+H] ⁺	760,59	$C_{42}H_{83}NO_8P^+$	10,25

Aby precyzyjniej zobrazować występujące różnice poniżej zamieszczono wykres (**Rys. 51**) ukazujący przebiegi zmian dla wybranych mas z **Tab. 20**.



Rys. 51. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów wybranych glicerofosfolipidów. Indeksy a, b, c przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych glicerofosfolipidów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Wykres ilustruje zmiany wartości intensywności pod wpływem przechowywania mięśni piersiowych brojlerów w warunkach chłodniczych przez okres 72 h, dla wybranych charakterystycznych jonów glicerofosfolipidów. Tak jak dla poprzednio rozważanych grup lipidowych i w tym przypadku dla wszystkich analizowanych jonów występuje istotna statystycznie różnica pomiędzy pierwszym i trzecim analizowanym okresem przechowywania mięsa w warunkach chłodniczych. Jedynie w przypadku jednego fragmentacyjnego jonu fosfatydyloetanoloaminy PE34:1 (m/z 756,55) zarejestrowano istotne statystycznie różnice pomiędzy wszystkimi trzema grupami doświadczalnymi. I tak, wartość intensywności tego jonu obniżała się istotnie w trakcie przechowywania próbek w warunkach chłodniczych począwszy od 24 h (grupa I) przez 48 h (grupa II) do 72 h (grupa III). Dla pozostałych jonów, ze względu na wnioski wynikające z statystycznego opracowania pomiarów, zmiany wartości intensywności można podzielić na trzy grupy.

Pierwsza, zawierająca jony o masach: m/z 678,49 (fragment fosfatydylocholiny PC 28:0), 717,45 (fragment fosfatydyloinozytolu PI34:2), 725,00 (fragment glicerofosfocholiny (16:0e/18:1)), charakteryzuje się istotnymi

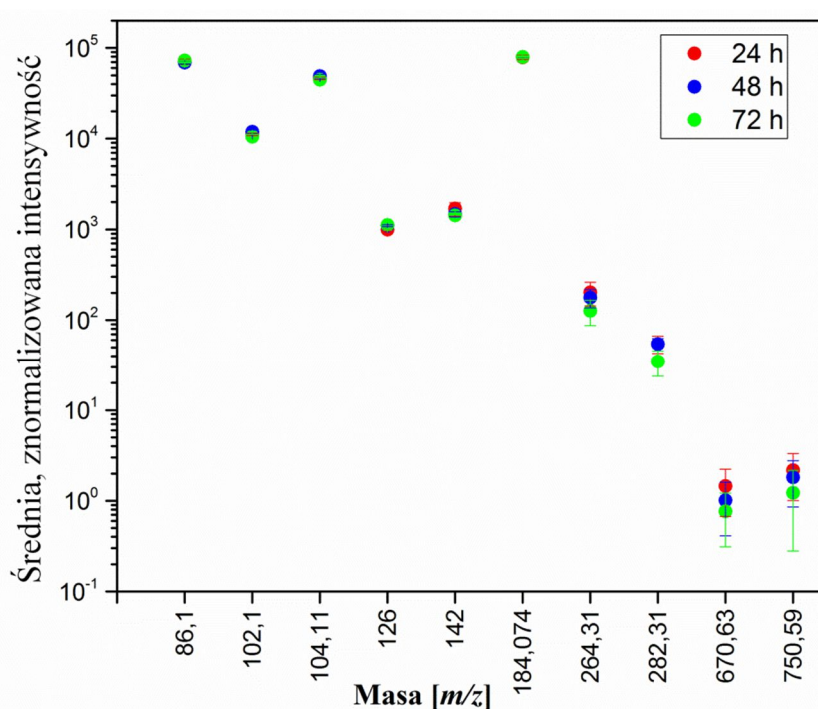
różnicami w wartościach intensywności jonów jedynie pomiędzy grupą I oraz III, gdzie istotnie wyższe wartości intensywności omawianych jonów wykazano w grupie I w stosunku do grupy najdłużej przechowywanej w warunkach chłodniczych, czyli grupy III. W drugiej grupie jonów obejmujących fragment fosfatydylocholiny PC28:0 (m/z 700,58), fragment glicerofosfocholiny (16:0e/18:1) o m/z 709,00 oraz fragment fosfatydyloetanolaminy PE32:0 (m/z 714,58), wykazano istotnie mniejsze wartości intensywności w grupie II i III, między którymi różnice były nieistotne statystycznie, w stosunku do grupy I. Dla pozostałych mas, a więc dla m/z 730,54 (fragment fosfatydyloetanolaminy PE32:0), 732,55 (fragment glicerofosfocholiny GPCho(32:1)), 734,57 (jon molekularny fosfatydylocholiny PC32:0), 746,57 (jon molekularny glicerofosfoetanolaminy GPETHn(36:1)), 758,57 (jon molekularny glicerofosfocholiny PC34:) oraz 760,59 (jon molekularny fosfatydylocholiny PC34:1) odnotowano istotnie niższe wartości dla grupy, w której fragmenty tkanek przechowywano najdłużej (III grupa) w stosunku do grup, gdzie tkanki przebywały w warunkach chłodniczych odpowiednio 24 h (I grupa) i 48 h (II grupa).

Wiele dotychczasowych badań wskazuje, że lipidy zawierające w swoim składzie dużą ilość fosfolipidów związanych z polienowymi kwasami tłuszczowymi są bardziej narażone na proces utleniania w stosunku do lipidów złożonych z glicerolipidów [142, 325]. Na podstawie pracy Pikul i Kummerow [326] można przypuszczać, iż fosfatydyloetanolamina jest główną frakcją fosfolipidów odpowiedzialną za jełczenie oksydacyjne mięsa ze względu na fakt wiązania znacząco większej ilości kwasów polienowych w stosunku do fosfatydylocholiny. Kolejnym istotnym lipidem biorącym udział w opisywanych reakcjach jest fosfatydyloinozytol, który zawiera najwięcej kwasów polienowych w swoim składzie, jednak jego udział w ogólnej ilości fosfolipidów mięsa drobiowego jest znacznie mniejszy [316].

Jednym z istotnych składników mięśni, obok włókien mięśniowych, jest tkanka tłuszczowa stanowiąca tzw. tłuszcz śródmięśniowy. Jak wskazują wcześniejsze badania [279], im większy jest udział tkanki tłuszczowej w mięsie, a więc większa zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach tej tkanki, tym szybciej zachodzą zmiany oksydacyjne. Wynika to z faktu, że występujące w tkance mięśniowej związki hemowe katalizują reakcje utleniania i z tego powodu są główną przyczyną jełczenia tłuszczu śródmięśniowego, który zbudowany jest w głównej mierze z fosfolipidów zawierających w dużej części wolne kwasy tłuszczowe [327]. Tak więc, w tym przypadku, czas przechowywania powinien być jak najkrótszy.

5.4. Sfingolipidy

Grupa sfingolipidów, będąca kolejną kategorią lipidową, której zmiany w zawartości poszczególnych tłuszczów zbadano techniką TOF-SIMS, jest przedmiotem analizy tego rozdziału pracy. Na **Rys. 52** umieszczono wyniki przeprowadzonych pomiarów, a więc znormalizowane, średnie wartości intensywności z 144 widm dla 10 wybranych mas, zidentyfikowanych jako masy odpowiadające charakterystycznym jonom sfingolipidów w polaryzacji dodatniej (aneks).



Rys. 52. Zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów sfingolipidów.

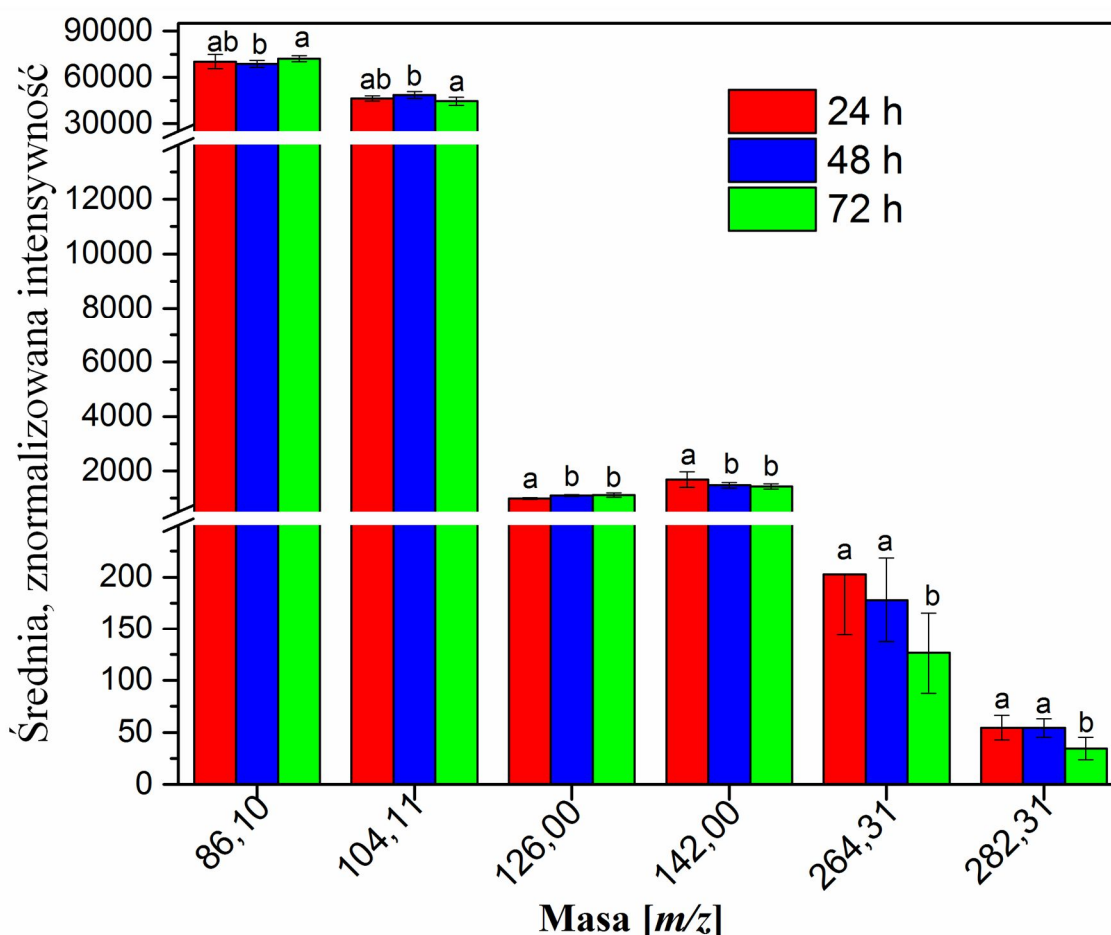
Z przedstawionej prezentacji widać, że dla mas większych od masy m/z 184,07 następuje spadek wartości średnich intensywności wraz z czasem przechowywania próbek mięśni piersiowych kurcząt brojlerów w warunkach chłodniczych. Jak w poprzednich przypadkach w **Tab. 21** przedstawiono wyniki analizy wariancji ANOVA, a **Rys. 53** prezentuje przebieg zmian dla wybranych jonów charakterystycznych grupy sfingolipidów.

Tab. 21. Analiza wariancji średnich, znormalizowanych intensywności jonów charakterystycznych sfingolipidów w polaryzacji dodatniej. Zgodnie z analizą wariancji dla $F > 3,01$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha = 0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Fragment sfingocholiny	86,10	$C_5H_{12}N^+$	3,50
Fragment ceramidu	104,11	$C_5H_{14}NO^+$	8,97
Fragment fosfosfingolipidu	126,00	$C_2H_9NPO^+$	18,12

Fragment fosfosfingolipidu	142,00	$C_2H_9NPO_4^+$	6,25
Fragment ceramidu	184,07	$C_5H_{15}PNO_4^+$	0,04
Fragment ceramidu 36:1 (18:0/18:1)	264,31	$C_{18}H_{32}O^+$	7,55
Fragment ceramidu 36:1 (18:0/18:1)	282,31	$C_{18}H_{34}O_2^+$	12,75

W tabeli umieszczono wyniki analiz dla 7 charakterystycznych jonów sfingolipidów w polaryzacji dodatniej, a na **Rys. 53** przedstawiono histogram zmian dla tych jonów.



Rys. 53. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów wybranych sfingolipidów. Indeksy a, b przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych sfingolipidów) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Opierając się na prezentowanych wynikach można stwierdzić, że wykazane zmiany grupują się zgodnie z podklasami lipidowymi, za wyjątkiem dwóch najmniejszych mas odpowiadających fragmentowi sfingocholiny o m/z 86,10 oraz fragmentowi ceramidu o m/z 104,11. I tak, dla dwóch wymienionych jonów istotne różnice w wartościach intensywności odnotowano pomiędzy II oraz III grupą badawczą, przy czym w przypadku fragmentu jonu sfingocholiny, odwrotnie niż to ma miejsce dla jonu fragmentacyjnego ceramidu o m/z 104,11, wartość intensywności w 72 h przechowywania (grupa III) wzrasta istotnie w stosunku do 48 h (grupa II). Zaobserwowane różnice w przypadku tych jonów, a w szczególności wykazany wzrost intensywności fragmentu jonu sfingocholiny

w 72 h, mogą wynikać z faktu, iż analizowane masy są stosunkowo niskie, co może się wiązać z prawdopodobieństwem, że są to fragmenty innych molekuł, nienależących do tej grupy lipidowej.

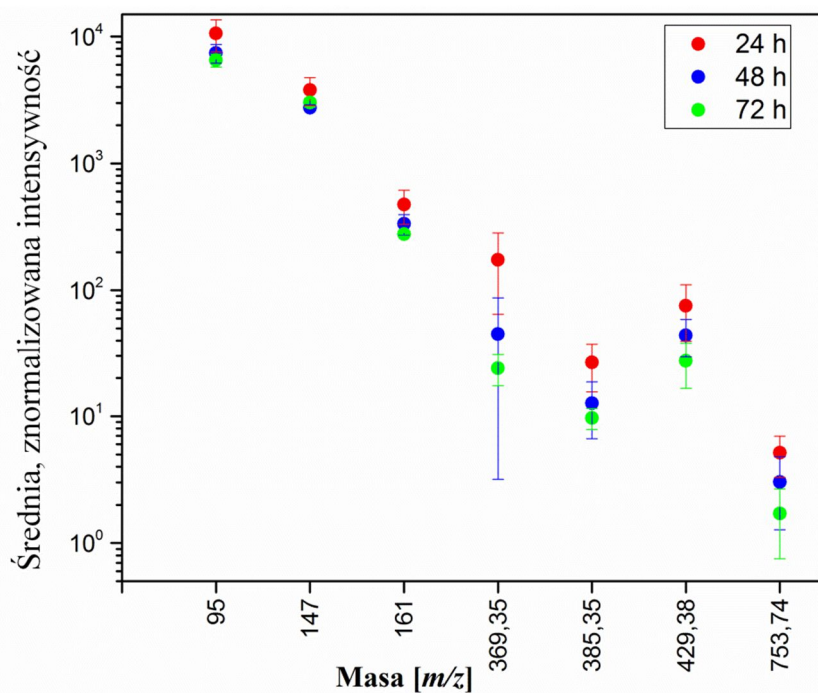
Wzrost wartości intensywności jonów w trakcie przechowywania chłodniczego wykazano także dla pierwszego fragmentu fosfosfingolipidu, a więc dla jonu o masie m/z 126, gdzie w grupie I odnotowano istotnie niższe wartości intensywności w stosunku do dwóch pozostałych grup, między którymi różnice nie były istotne statystycznie. W przypadku tego jonu również istnieje prawdopodobieństwo, iż jest to jon fragmentacyjny dla innych molekuł, a to może być przyczyną dla której otrzymane wyniki różnią się od pozostałych rezultatów otrzymanych w tej części eksperymentalnej. Przebieg zmian dla drugiego charakterystycznego fragmentu fosfosfingolipidu (m/z 142) wskazuje, że w I grupie badawczej, najkrócej przechowywanej w warunkach chłodniczych, wartość intensywności jest istotnie wyższa w porównaniu z pozostałymi analizowanymi okresami przechowywania mięsa (grupa II i III).

Z kolei, w przypadku obu charakterystycznych fragmentów ceramidu, a więc dla m/z 264,31 oraz m/z 282,31 spadek wartości intensywności tych jonów następuje dopiero w grupie III w porównaniu do grupy I oraz II, a więc w grupie najdłużej przechowywanej w warunkach chłodniczych (72 h).

Większość produktów pochodzenia zwierzęcego (drób, wołowina czy też mleko) ma szerokie spektrum występujących klas sfingolipidów, z tego powodu grupa ta nie jest łatwa do ilościowego scharakteryzowania [71]. Strukturalna różnorodność i brak materiału odniesienia stanowią szczególny problem w analizie sfingolipidów w żywności. Dostępne wyniki tandemowej spektrometrii masowej są jedynymi umożliwiającymi ilościowe określenie złożonych sfingolipidów, jednak i te nie umożliwiają przeprowadzenia analizy porównawczej dla tej grupy lipidów [328]. Z tych powodów otrzymane w niniejszym eksperymencie wyniki wnoszą cenne informacje o zmianie zawartości poszczególnych lipidów z tej grupy w trakcie przechowywania chłodniczego i mogą stanowić dobry prognostyk do dalszych badań.

5.5. Sterole

Przedmiotem rozważań w tym podrozdziale jest grupa steroidów, której najważniejszym przedstawicielem jest cholesterol. Analogicznie jak w poprzedzających częściach, analizę rozpoczyna wykres przedstawiający zmiany średnich wartości znormalizowanych intensywności z widm uzyskanych dzięki technice TOF-SIMS. Na **Rys. 54** zamieszczono wyniki dla 7 mas odpowiadających jonom charakterystycznym dla steroli w polaryzacji dodatniej.



Rys. 54. Zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów steroli.

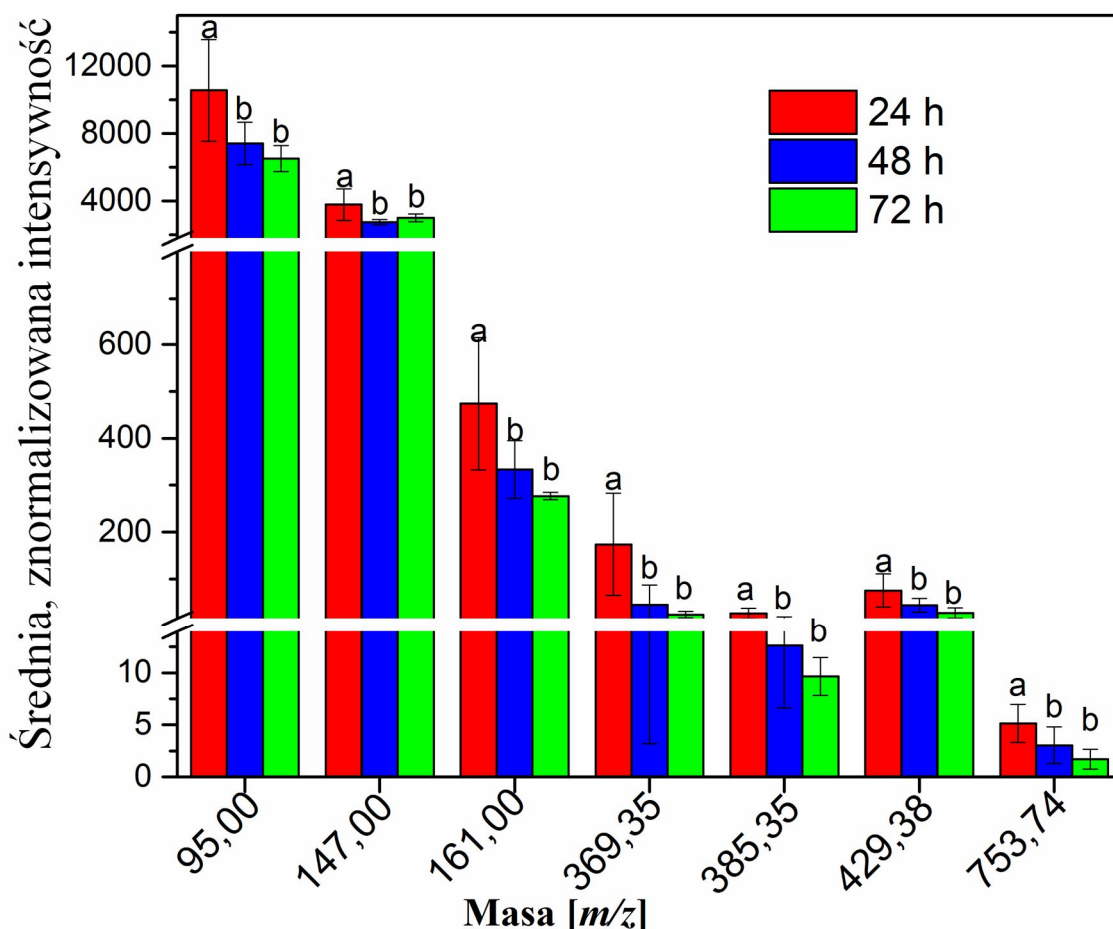
Analizując zebrane dane można stwierdzić, iż dla prawie wszystkich (poza masą m/z 147) przedstawionych mas najmniejsze wartości intensywności występują w grupie, w której tkanki przechowywano najdłużej w warunkach chłodniczych. Powyższe dane informują również, że największe wartości intensywności, w tym przypadku bez wyjątku, przyporządkowane są grupie I, a więc grupie w której próbki pobrano po 24 h przechowywania w warunkach chłodniczych. Uzupełniając dotychczasową analizę w **Tab. 22** zestawiono wyniki analizy wariancji ANOVA.

Tab. 22. Analiza wariancji średnich, znormalizowanych intensywności jonów charakterystycznych steroli w polaryzacji dodatniej. Zgodnie z analizą wariancji dla $F > 3,01$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha = 0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Fragment cholesterolu i pochodnych	95,00	$C_7H_{11}^+$	13,22
Fragment cholesterolu i pochodnych	147,00	$C_{11}H_{15}^+$	10,24
Fragment cholesterolu i pochodnych	161,00	$C_{12}H_{17}^+$	12,69
Fragment cholesterolu $[M+H-H_2O]^+$	369,35	$C_{27}H_{45}^+$	15,80
Jon molekularny cholesterolu $[M-H]^+$	385,35	$C_{27}H_{46}O^+$	16,79
Jon molekularny 7-ketocholesterol $[M+H]^+$	429,38	$C_{29}H_{49}O_2^+$	12,19
Podwojona cząsteczka cholesterolu $[2M-H_3O]^+$	753,74	$(C_{27}H_{44})_2OH^+$	13,41

Rezultaty umieszczone tabeli wskazują, iż dla wszystkich wyszczególnionych mas charakterystycznych dla steroli występują istotne

statystycznie zmiany międzygrupowe. Można również dostrzec, że współczynnik F_1 rozkładu F-Snedecora przyjmuje przybliżone wartości dla analizowanych mas. W celu dokładniejszej analizy poszczególnych różnic dla wszystkich mas wykonano histogram (Rys. 55) wartości średnich, znormalizowanych intensywności w zależności od czasu przechowywania próbek mięśni piersiowych kurcząt brojlerów w warunkach chłodniczych, w temperaturze 4°C.



Rys. 55. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów wybranych steroli. Indeksy a, b przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych steroli) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

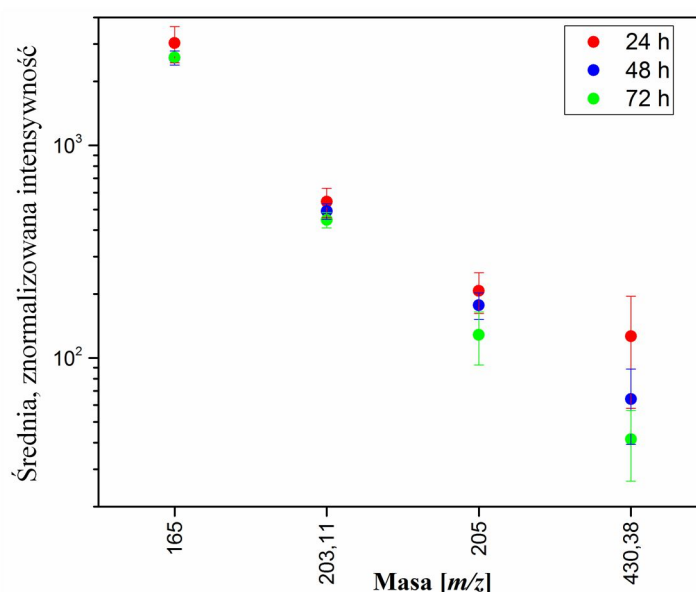
Jak widać z histogramu dla wszystkich zebranych w **Tab. 22** charakterystycznych jonów wykazane zmiany są jakościowo takie same. Oznacza to, iż największe wartości średnich intensywności przypisuje się grupie I w stosunku do grupy II i III, między którymi nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. Stąd też, można przypuszczać, iż największy spadek zawartości lipidów z grupy sterolowej następuje między pierwszą a drugą dobą przechowywania mięsa w warunkach chłodniczych. Niższy poziom cholesterolu w mięsie drobiowym wykazany w niniejszej pracy w 48 h i 72 h po uboju wiąże się najprawdopodobniej z procesem utleniania cholesterolu [308, 309].

W omówionej, w pierwszym cyklu prac doświadczalnych, analizie grupy sterolowej zawarto uzasadnienie braku możliwości rozróżnienia w strukturze tkanki frakcji cholesterolu (HDL, LDL) przy użyciu wykorzystywanej techniki.

A więc, nie jest możliwe ustalenie efektu biologicznego czasu przechowywania. Równocześnie coraz więcej badań wskazuje na niejednoznaczne dowody negatywnego wpływu spożycia cholesterolu w żywności pochodzenia zwierzęcego [329]. Z drugiej strony, jak podaje Staprans i in. [330] spożywanie pokarmu zawierającego utlenione formy cholesterolu, nazwane oksysterolami lub produktami utleniania cholesterolu (COPs, ang. *cholesterol oxidation compounds*), może przyczynić się do wzrostu prawdopodobieństwa chorób serca i układu krwionośnego [331]. Wyróżnia się kilka form oksysteroli obecnych w żywności, tj. 7-ketocholesterol, 7 α - i 7 β -hydroksycholesterol, 5 α ,6 α -epoksycholesterol i inne [332, 333]. Zgodnie z tym co podaje Vejux i in. [332], oksysterole w sposób szybszy i efektywniejszy wnikają przez jelita do tkanek. Potwierdzają to również badania z królikami żywionymi dietą zawierającą utleniony cholesterol, u których zdiagnozowano obecność oksysteroli w osoczu oraz nacieki na naczyniach krwionośnych charakterystyczne dla arterosklerozy [330]. Stwierdzono również, że utlenione formy cholesterolu intensyfikują rozwój stanów zapalnych oraz zwiększają prawdopodobieństwo rozwoju choroby Alzheimera [332, 334]. Stąd też, informacje na temat zmiany stopnia utlenienia cholesterolu w tkankach zwierząt hodowlanych w trakcie ich przechowywania są z punktu widzenia konsumenta istotne i mogą posłużyć do dokładnego określenia 'bezpiecznego' czasu przechowywania produktów pochodzenia zwierzęcego.

5.6. Prenole

Ostatnią analizowaną grupą lipidową jest grupa prenolowa, której kluczowym przedstawicielem, o właściwościach przeciwutleniających, jest witamina E. Wykres zestawiający średnie wartości znormalizowanych intensywności dla 144 widm zmierzonych techniką TOF-SIMS, w przypadku jonów charakterystycznych dla witaminy E, znajduje się na **Rys. 56**.



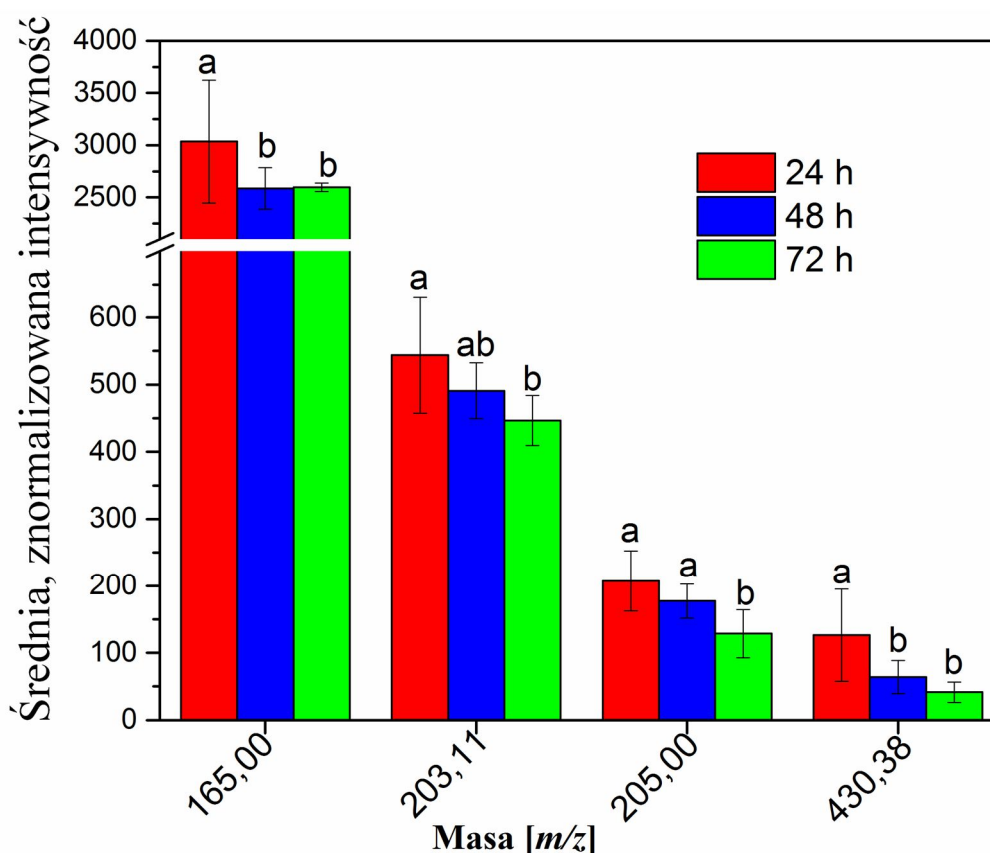
Rys. 56. Zestawienie średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów prenoli.

Jedynym wspólnym mianownikiem zestawionych danych to fakt, iż dla wszystkich czterech mas największe wartości intensywności są przypisane grupie I, a więc grupie w której znajdują się próbki przechowywane w warunkach chłodniczych 24 h. Aby dokonać przeglądu innych wspólnych cech lub różnic w **Tab. 23** zamieszczono wyniki jednoczynnikowej analizy ANOVA.

Tab. 23. Analiza wariancji średnich, znormalizowanych intensywności jonów charakterystycznych prenoli w polaryzacji dodatniej. Zgodnie z analizą wariancji dla $F > 3,01$ występuje różnica międzygrupowa na poziomie ufności $\alpha = 0,05$

<i>Lipid</i>	<i>Masa [m/z]</i>	<i>Wzór sumaryczny</i>	<i>Wynik testu analiz wariancji ANOVA, F_1</i>
Fragment α - tokoferolu	165,00	$C_{10}H_{13}O_2^+$	5,30
Fragment α - tokoferolu	203,11	$C_{13}H_{15}O_2^+$	7,46
Fragment α - tokoferolu	205,00	$C_{13}H_{17}O_2^+$	13,16
Jon molekularny dla witaminy E [M+H] ⁺	430,38	$C_{29}H_{50}O_2^+$	11,53

Dla wszystkich wymienionych mas w tabeli wynik analizy wariancji ANOVA wykazał istotne statystycznie różnice międzygrupowe. Aby móc dokładniej zaobserwować zdiagnozowane zmiany, na **Rys. 57** zamieszczony został histogram wartości intensywności w zależności od czasu przechowywania mięśni piersiowych kurcząt brojlerów w warunkach chłodniczych.



Rys. 57. Histogram średnich, znormalizowanych intensywności dodatnich, charakterystycznych jonów wybranych prenoli. Indeksy a, b przypisane wartościom średnim i oznaczone różnymi literami (pomiędzy grupami, w obrębie poszczególnych prenoli) różnią się istotnie przy $p \geq 0,05$.

Przedstawione wyniki wskazują, iż dla wszystkich charakterystycznych jonów w tej grupie lipidowej występuje statystycznie istotna różnica pomiędzy próbkami mięśni przechowywanymi w warunkach chłodniczych, gdzie istotnie wyższe wartości intensywności przypisane są grupie I. Co więcej, dla fragmentu jonu α -tokoferolu (m/z 203,11) jest to jedyna statystycznie istotna różnica pomiędzy trzema grupami eksperymentalnymi.

W przypadku dwóch mas odpowiadających fragmentowi α -tokoferolu (m/z 165) oraz jonowi macierzystemu witaminy E (m/z 430,38), wartości dla grupy I istotnie przewyższają wartości dla grupy II oraz III, między którymi nie odnotowano istotnych statystycznie różnic. Z kolei, dla fragmentu jonu α -tokoferolu o masie m/z 205,00 istotny spadek wartości intensywności stwierdzono w grupie najdłużej przechowywanej w warunkach chłodniczych (grupa III) w stosunku do grupy I i II przechowywanych odpowiednio 24 h i 48 h.

Ze względu na swoje właściwości, witamina E jest uważana za jeden z najskuteczniejszych biologicznych przeciwutleniaczy, który niweluje wolne rodniki nadtlenowe odpowiadające za uszkodzenia strukturalne w komórce i DNA oraz, co równie istotne, inhibituje oksydację lipidów [98]. Z przeprowadzonej analizy wynika, iż na przestrzeni 72 godzin przechowywania chłodniczego mięśni piersiowych kurcząt brojlerów znacząco spada poziom tego lipidu. Może to oznaczać, że w tym czasie tokoferol wchodzi w reakcje z innymi cząsteczkami znajdującymi się w badanej strukturze. Silne właściwości antyoksydacyjne tej molekuly wielokrotnie wykorzystywano do badania możliwości zahamowania reakcji oksydacyjnych [98, 335]. Dla przykładu Coetzee i Hoffman [336] wykazali istotny wzrost stabilności oksydacyjnej lipidów w tkance tłuszczowej broilerów w trakcie przechowywania chłodniczego i w stanie zamrożonym. Dodatkowo, w swojej pracy podali czas, o które wydłużyła się przydatność mięsa do spożycia, po odpowiednich dawkach witaminy E w diecie broilerów. Reasumując, wiedza na temat zmian zawartości lipidów z grupy prenoli jest przydatna i może być wykorzystana do dalszego udoskonalania planu żywieniowego zwierząt w celu optymalizacji czasu przydatności do spożycia produktów pochodzenia zwierzęcego.

Podsumowanie

Celem przedłożonej pracy było ukazanie wyników badań profili lipidowych wybranych układów biologicznych techniką spektrometrii masowej TOF-SIMS. Zamieszczony w pracy opis eksperymentów bezpośrednio łączy w sobie wiedzę biologiczną i zagadnienia z zakresu fizyki. Na podstawie otrzymanych wyników oraz wynikających z nich wniosków uzasadniono wybór wykorzystanych układów biologicznych, problematyki związanej z lipidami, jak również zastosowanej techniki badawczej.

Przeprowadzone pomiary potwierdziły, że technika TOF-SIMS jest skuteczną metodą do porównywania względnych poziomów lipidów oraz określania różnic występujących między próbkami biologicznymi. Technika ta ma ogromny potencjał i możliwości w odniesieniu do ogromnej ilości możliwych zastosowań biofizycznych. W badaniach biologicznych i medycznych ciągle istnieją limity eksperymentalnej natury, które ograniczają stosowalność poszczególnych metod badawczych. W technice SIMS problemem jest złożoność otrzymywanych wyników, która wymaga stosowania wieloczynnikowych metod komputerowych i statystycznych ułatwiających zrozumienie i interpretację widm masowych, jak również preparatyka próbek do badań w ultra wysokiej próżni. Jest to tym bardziej istotne, jeśli badaną materią są układy biologiczne, o wysoce złożonych strukturach i wysokim stopniu uwodnienia. Należy jednak podkreślić, iż wielką zaletą tej techniki, w stosunku do innych stosowanych w biologii, jest możliwość badania układu biologicznego w jego natywnym stanie z wysoką rozdzielczością masową, co w metodach biochemicznych jest w większości przypadków niemożliwe.

Efekty przeprowadzonych eksperymentów, których wyniki i analiza znalazły miejsce w tej pracy, mają istotny aspekt praktyczny. Zbadanie wpływu zastosowania różnych źródeł tłuszczu w diecie zwierząt na zawartość poszczególnych lipidów daje możliwość wykorzystania uzyskanych informacji do regulacji poziomów lipidowych w mięsie w celu uzyskania tzw. żywności funkcjonalnej. Rezultaty otrzymane w przypadku badania wpływu długości przechowywania mięśni piersiowych kurcząt brojlerów w warunkach chłodniczych mogą pomóc w zrozumieniu reakcji zachodzących w układzie biologicznym jakim jest tkanka, co więcej mogą stanowić istotny wkład w poprawę jakości spożywanego mięsa przez konsumenta.

Badania i rozważania podjęte w pracy nie wyczerpują całokształtu problematyki, stwarzają natomiast nową perspektywę do dalszych badań skupionych na zastosowaniu tej techniki spektrometrycznej do analiz porównawczych profili lipidowych układów biologicznych poddanych wpływowi różnych czynników zarówno genetycznych jak i środowiskowych.

Wnioski

Najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych eksperymentów podano poniżej:

- I) Zastosowanie olejów roślinnych w żywieniu zwierząt determinuje profil lipidowy tkanek mięśni piersiowych kurcząt brojlerów, przy czym w przypadku kwasów tłuszczowych profil lipidowy włókien mięśniowych jak i tłuszczu śródmięśniowego jest odzwierciedleniem składu stosowanych tłuszczu jako dodatków paszowych.
- II) Zarówno we włóknach mięśniowych jak i tłuszczu śródmięśniowym najkorzystniejszy dla zdrowia człowieka stosunek kwasów tłuszczowych ω -6/ ω -3 występuje w grupie, w której zastosowano mieszaninę olejów roślinnych (sojowy i lniany) oraz w grupie suplementowanej olejem lnianym.
- III) Wzbogacanie paszy zwierząt jednym typem oleju roślinnego skutkuje istotnym wzrostem zawartości większości lipidów z grup glicerolipidów (w szczególności trójglicerydów), fosfatydylocholin oraz sfingolipidów oraz spadkiem poziomu cholesterolu w obu badanych strukturach (włóknach mięśniowych i tłuszczu śródmięśniowym).
- IV) Zastosowanie w diecie kurcząt brojlerów olejów roślinnych w istotnym stopniu zwiększa zawartość ważnego biologicznie antyoksydantu, witaminy E we włóknach mięśniowych oraz w tłuszczu śródmięśniowym mięśni piersiowych.
- V) Stabilność lipidów mięśni piersiowych kurcząt brojlerów warunkowana jest czasem przechowywania mięsa w warunkach chłodniczych, o czym świadczy spadek wartości średnich, znormalizowanych intensywności jonów charakteryzujących dla poszczególnych grup lipidowych na przestrzeni 72h.

Metoda TOF-SIMS umożliwia otrzymanie użytecznych informacji w analizie porównawczej tkanek mięśni zwierząt hodowlanych i ułatwia zdobycie nowych, do niedawna niedostępnych, informacji pomocnych w zrozumieniu biologii i chemii procesów związanych z lipidami.

Bibliografia

- [1] Navas-Iglesias, N.; Carrasco-Pancorbo, A.; Cuadros-Rodríguez, L.; From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics, *Trends in Analytical Chemistry*. 2009, 28(4), 393-403.
- [2] Christie, W.W.; *Lipid Analysis*, Pergamon Press, New York, 1982.
- [3] Kates, M.; *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis, and Identification of Lipids.*, Elsevier Science Pub. Co., New York, 1986.
- [4] Morrison, R.T.; Boyd, R.N.; *Chemia organiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1996.
- [5] Vance, D.; Vance, J.; *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Elsevier Science, New York, 2008.
- [6] Gurr, M.I.; James, A.T.; *Lipid Biochemistry and Introduction*, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1971.
- [7] The American Oil Chemists' Society; *The Lipid Library website*. <http://lipidlibrary.aocs.org/>, Boulder, Urbana, USA, [14.02.2018].
- [8] Solomon, E.P.; Berg, L.; Martin, D.W.; *Biologia*, MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa, 2000.
- [9] Fernandez, J.A; Ochoa B.; Fresnedo O.; Giralte, M.T.; Rodriguez-Puertas, R.; Matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry in lipidomics, *Anal Bioanal Chem*. 2011, 401(1), 29-51.
- [10] LIPID MAPS University of California; LIPID MAPS Lipidomics Gateway. <http://www.lipidmaps.org/>, San Diego, California, USA, [14.02.2018].
- [11] Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H.A.; Glass C.K.; Merrill, A.H. Jr., Murphy, R.C., C.R.H. Murphy, Raetz, R.C.; Russell, D.W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; VanNieuwenhze, M.S.; White, S.H.; Witztum, J.L.; Dennis, E.A.; A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*. 2005, 46(5), 839-61.
- [12] Fahy, E.; Subramaniam, S.; Murphy, R.C.; Nishijima, M.; Raetz, C.R.H.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; Wakelam, M.J.O.; Dennis, E.A.; Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids, *J Lipid Res*. 2009, 50(Supplement), 9-14.
- [13] Cooper, G.; *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition., Sinauer Associates, Sunderland (MA), 2000.
- [14] Stryer, L.; Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2011.
- [15] Irvine, R.F.; Nuclear lipid signalling, *Sci STRE*. 2000, 2000(48):re1.
- [16] Johansson, B.; ToF-SIMS imaging of lipids in cell membranes, *Surface and Interface Analysis*. 2006, 38(11), 1401-1412.
- [17] Fernandis, A.Z.; Wenk, M.R.; Membrane lipids as signaling molecules, *Curr Opin Lipidol*. 2007, 18(2), 121-128.
- [18] McCusker, M.M.; Grant-Kels, J.M. ; Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the omega-6 and omega-3 fatty acids, *Clin Dermatol*. 2010, 28(4), 440-451.
- [19] Nicolaou, A.; Eicosanoids in skin inflammation, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013, 88(1), 131-138.
- [20] van Meer, G.; Voelker D.R.; Feigenson, G.W.; Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008, 9(2), 112-124.
- [21] Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Garland Science, New York, 2002.
- [22] Holthuis, J.C.M.; Levine, T.P.; Lipid traffic: floppy drives and a superhighway, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005, 6(3), 209-220.
- [23] Murphy, S.A.; Nicolaou, A.; Lipidomics applications in health, disease and nutrition research, *Molecular Nutrition & Food Research*. 2013, 57(8), 1336-1346.

- [24] Gross, R.W.; Han, X.; Lipidomics at the interface of structure and function in systems biology, *Chem Biol.* 2011, 18(3), 284–291.
- [25] Wenk, M.R.; Lipidomics: new tools and applications, *Cell.* 2010, 143(6), 888-895.
- [26] Watson, A.D.; Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems, *J Lipid Res.* 2006, 47(10), 2101-2111.
- [27] Bou Khalil, M.; Hou, W.; Zhou, H.; Elisma, F.; Swayne, L.A.; Blanchard, A.P.; Yao, Z.; Bennett, S.A.; Figeys, D.; Lipidomics era: accomplishments and challenges, *Mass Spectrom Rev.* 2010, 29(6), 877-929.
- [28] Wolf, C.; Quinn, P.J.; Lipidomics: practical aspects and applications, *Prog Lipid Res.* 2008, 47(1), 15-36.
- [29] Massey, K.A.; Nicolaou, A.; Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids, *Free Radic Bio Med.* 2013, 59, 45-55.
- [30] Hulbert, A.J.; Turner, N.; Storlien, L.H.; Else, P.L.; Else, Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease, *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2005, 80(1), 155-169.
- [31] Decsi, T.; Csabi, G.; Torok, K.; Erhardt, E.; Minda, H.; Burus, I.; Molnar, D.; Polyunsaturated fatty acids in plasma lipids of obese children with and without metabolic cardiovascular syndrome, *Lipids.* 2000, 35(11), 1179-1184.
- [32] Murray, R.; Granner, D.; DVictor, R.; *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2008.
- [33] Akoh, C.C.; Min, D.B.; *Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, 2008.
- [34] Vance, D.; Vance, J.; *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th Edition, Elsevier Science, New York, 2002.
- [35] Garrett, R.H.; Grisham, C.M.; *Biochemistry*, Saunders College Publishing, Orlando, 1995.
- [36] Newton, I.S.; Long chain fatty acids in health and nutrition, *Journal of Food Lipids.* 1996, 3(4), 233-249.
- [37] Burr, G.O.; Burr, M.M.; A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet, *Journal of Biological Chemistry.* 1929, 82(2), 345-367.
- [38] Mead, J.F.; The essential fatty acids: past, present and future, *Progress in Lipid Research.* 1981, 20, 1-6.
- [39] Flachs, P.; Rossmeisl, M.; Bryhn, M.; Kopecky, J.; Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism, *Clin Sci (Lond).* 2009, 116(1), 1-16.
- [40] Seubert, W.; Podack, E.R.; Mechanisms and physiological roles of fatty acid chain elongation in microsomes and mitochondria, *Molecular and Cellular Biochemistry.* 1973, 1(1), 29-40.
- [41] Park, W.J.; Kothapalli, K.S.D.; Lawrence, P.; Tyburczy, C.; Brenna, J.T.; An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product $\Delta 8$ -desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3, *Journal of Lipid Research.* 2009, 50(6), 1195-1202.
- [42] Sprecher, H.; Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids, *Biochim Biophys Acta.* 2000, 1486(2-3), 219-231.
- [43] Weylandt, K.H.; Krause, L.F.; Gomolka, B.; Chiu, C.Y.; Bilal, S.; Nadolny, A.; Waechter, S.F.; Fischer, A.; Rothe, M.; Kang, J.X.; Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF-alpha, *Carcinogenesis.* 2011, 32(6), 897-903.
- [44] Hawcroft, G.; Loadman, P.M.; Belluzzi, A.; Hull, M.A.; Effect of eicosapentaenoic acid on E-type prostaglandin synthesis and EP4 receptor signaling in human colorectal cancer cells, *Neoplasia.* 2010, 12(8), 618-627.
- [45] Gleissman, H.; Yang, R.; Martinod, K.; Lindskog, M.; Serhan, C.N.; Johnsen, J.I.; Kogner, P.; Docosahexaenoic acid metabolome in neural tumors: identification of cytotoxic intermediates, *FASEB J.* 2010, 24(3), 906-915.
- [46] Freedman, R.S.; Wang, E.; Voiculescu, S.; Patenia, R.; Bassett, R.L. Jr; Deavers, M.; Marincola, F.M.; Yang, P.; Newman, R.A.; Comparative analysis of peritoneum and tumor eicosanoids and pathways in advanced ovarian cancer, *Clin Cancer Res.* 2007;13(19), 5736-5744.

- [47] Mal, M.; Koh, P.K.; Cheah, P.Y.; Chan, E.C.Y.; Ultra-pressure liquid chromatography/tandem mass spectrometry targeted profiling of arachidonic acid and eicosanoids in human colorectal cancer, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011, 25(6), 755-764.
- [48] Serhan, C.N.; Hong, S.; Gronert, K.; Colgan, S.P.; Devchand, P.R.; Mirick, G.; Moussignac, R.L.; Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals, *J Exp Med*. 2002 196(8), 1025-1037.
- [49] Beblo, S.; Reinhardt, H.; Demmelmair, H.; Muntau, A.C.; Koletzko, B.; Effect of fish oil supplementation on fatty acid status, coordination, and fine motor skills in children with phenylketonuria, *J Pediatr*. 2007, 150(5), 479-484.
- [50] Koletzko, B.; Cetin, I.; Brenna, J.T.; Dietary fat intakes for pregnant and lactating women, *Br J Nutr*. 2007, 98(5), 873-877.
- [51] Kompauer, I.; B. Demmelmair, H.; Koletzko, B.; Bolte, G.; Linseisen, J.; Heinrich, J.; Association of fatty acids in serum phospholipids with hay fever, specific and total immunoglobulin E, *Br J Nutr*. 2005, 93(4), 529-535.
- [52] Trak-Fellermeier, M.A.; Brasche, S.; Winkler, G.; Koletzko, B.; Heinrich, J.; Food and fatty acid intake and atopic disease in adults, *Eur Respir J*. 2004, 23(4), 575-582.
- [53] Calder, P.C.; Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma, *Eur J Pharmacol*. 2011, 668 Suppl 1, 50-58.
- [54] International Union Of Pure And Applied Chemistry 1998. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/iubmb.html>, London, UK, [14.02.2018].
- [55] Luzzati, V.; X-ray diffraction studies of lipid-water systems. In: Chapman D (ed) Biological membranes, physical fact and function., Academic Press, London, 1968.
- [56] Stam, H.; Schoonderwoerd, K.; Hulsmann, W.C.; Synthesis, storage and degradation of myocardial triglycerides, *Basic Res Cardiol*. 1987;82 Suppl 1, 19-28.
- [57] Coleman, R.A.; Lee, D.P.; Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation, *Prog Lipid Res*. 2004, 43(2), 134-176.
- [58] Pahlsson, P.; Spitalnik S.L.; Spitalnik, P.F.; Fantini, J.; O. Fantini J.; Rakotonirainy, O.; Ghardashkhani, S.; Lindberg, J.; Konradsson, P.; Larson, G.; Characterization of galactosyl glycerolipids in the HT29 human colon carcinoma cell line, *Arch Biochem Biophys*. 2001, 396(2), 187-198.
- [59] Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.; *Molecular Cell Biology*. 4th edition., W. H. Freeman, New York, 2000.
- [60] Holst, O.; *Glycolipids: Occurrence, Significance, and Properties*, Springer, Berlin Heidelberg 2008, 1603-1627.
- [61] Privett, O.S.; Blank, M.L.; A new method for the analysis of component mono-, di-, and triglycerides, *Journal of Lipid Research*. 1961, 2(1), 37-44.
- [62] Yeagle, P.L.; Lipid regulation of cell membrane structure and function, *FASEB J*. 1989, 3(7), 1833-1842.
- [63] Fadeel, B.; Xue, D.; The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2009, 44(5), 264-277.
- [64] Schmitz, G.; Müller, G.; Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids, *Journal of Lipid Research*. 1991, 32(10), 1539-1570.
- [65] Veldhuizen, R.; Nag, K.; Orgeig, S.; Possmayer, F.; The role of lipids in pulmonary surfactant, *Biochim Biophys Acta*. 1998, 1408(2-3), 90-108
- [66] Yu, S.H.; Possmayer, F.; Lipid compositional analysis of pulmonary surfactant monolayers and monolayer-associated reservoirs, *J Lipid Res*. 2003, 44(3), 621-629.
- [67] O'Brien, J.S.; Rouser, G.; The fatty acid composition of brain sphingolipids: sphingomyelin, ceramide, cerebroside, and cerebroside sulfate, *J Lipid Res*. 1964, 5(3), 339-342.
- [68] Ramstedt, B.; Slotte, J.P.; Membrane properties of sphingomyelins, *FEBS Letters*. 2002, 531(1), 33-37.

- [69] Ramstedt, B.; Leppimäki P.; Axberg, M.; Slotte, J.P.; Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography, *FEBS J.* 1999, 266(3), 997-1002.
- [70] Yawata, Y.; *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model*, WILEY, 2003.
- [71] Merrill, A.H. Jr.; Schmelz, E.M.; Dillehay, D.L.; Spiegel, S.; Shayman, J.A.; Schroeder, J.J.; Riley, R.T.; Voss, K.A.; Wang, E.; Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology, *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997, 142(1), 208-225.
- [72] Gangoiti, P.; Camacho L., Arana, L.; Ouro, A.; Granado, M.H.; Brizuela, L.; Casas, J.; Fabrias, G.; Abad, J.L.; Delgado, A.; Gomez-Munoz, A.; Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease, *Prog Lipid Res.* 2010, 49(4), 316-334.
- [73] van Echten-Deckert, G.; Herget, T.; Sphingolipid metabolism in neural cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 2006, 1758(12), 1978-1994.
- [74] Russell, D.W.; Cholesterol biosynthesis and metabolism, *Cardiovasc Drugs Ther.* 1992, 6(2), 103-110.
- [75] Nes, W.D.; Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols, *Chemical Reviews.* 2011, 111(10), 6423-6451.
- [76] Bretscher, M.S.; Munro, S.; Cholesterol and the Golgi apparatus, *Science.* 1993, 261(5126), 1280-1291.
- [77] Lange, Y.; Swaisgood, M.H.; Ramos, B.V.; Steck, T.L.; Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts, *Journal of Biological Chemistry.* 1989, 264(7), 3786-3793.
- [78] Mouritsen, O.G.; Jorgensen, K.; Dynamical order and disorder in lipid bilayers, *Chem Phys Lipids.* 1994, 73(1-2), 3-25.
- [79] Incardona, J.P.; Eaton, S.; Cholesterol in signal transduction, *Curr Opin Cell Biol.* 2000, 12(2), 193-203.
- [80] Ikonen, E.; Parton, R.G.; Caveolins and cellular cholesterol balance, *Traffic.* 2000, 1(3), 212-217.
- [81] Simons, K.; Ikonen, E.; Functional rafts in cell membranes, *Nature.* 1997, 387(6633), 569-572.
- [82] Pfrieger, F.W.; Role of cholesterol in synapse formation and function, *Biochim Biophys Acta.* 2003, 1610(2), 271-280.
- [83] Traczyk, W.Z.; Trzebski, A.; *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2007.
- [84] Bruce, C.; Tall, A.R.; Cholesteryl ester transfer proteins, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol.* 1995, 6(5), 306-311.
- [85] Kuzuyama, T.; Seto, H.; Diversity of the biosynthesis of the isoprene units, *Natural Product Reports.* 2003, 20(2), 171-183.
- [86] Belu, A.M.; Graham, D.J.; Castner, D.G.; Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces, *Biomaterials.* 2003, 24(21), 3635-3653.
- [87] Sano, M.; Ernesto, C.; Thomas, R.G.; Klauber, M.R.; Schafer, K.; Grundman, M.; Woodbury, P.; Growdon, J.; Cotman, C.W.; Pfeiffer, E.; Schneider, L.S.; Thal, L.J.; A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study, *N Engl J Med.* 1997, 336(17), 1216-1222.
- [88] Goss-Sampson, M.A.; Kriss, A.; Muller, D.P.; A longitudinal study of somatosensory, brainstem auditory and peripheral sensory-motor conduction during vitamin E deficiency in the rat, *J Neurol Sci.* 1990, 100(1-2), 79-84.
- [89] Craig, R. W.; *Molecular structure of the sarcomere*, in: *Myology*, McGraw-Hill, New York, 2004, 129-166.
- [90] Ławniczak, A.; Kmiec, Z.; Zmiany mięśni szkieletowych w trakcie starzenia: fizjologia, patologia i regeneracja, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 2012, (66), 392-400.
- [91] Sawicki, W.; *Histologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2012.

- [92] Purslow, P.P.; Intramuscular connective tissue and its role in meat quality, *Meat Sci.* 2005, 70(3), 435-447.
- [93] Kuryszko, J.; Zakrzycki, J.; *Histologia zwierząt*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 2000.
- [94] Machado, A.P.; Costa Rosa, L.F.; Seelaender, M.C.; Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration, *Cell and Tissue Research.* 2004, 318(3), 503-514.
- [95] Poulos, S.; Hausman, G.; Intramuscular adipocytes – potential to prevent lipotoxicity in skeletal muscle, *Adipocytes.* 2005, 79-94.
- [96] Smekal, G.; von Duvillard, S.P.; Pokan, R.; Tschann, H.; Baron, R.; Hofmann, P.; Wonisch, M.; Bachl, N.; Effect of endurance training on muscle fat metabolism during prolonged exercise: agreements and disagreements, *Nutrition.* 2003, 19(10), 891-900.
- [97] Grabowski, T.; *Technologia mięsa drobiowego. Surowiec do produkcji mięsa drobiowego*, WNT, Warszawa, 1993.
- [98] Narciso-Gaytán, C.; Shin, D.; Sams, A.R.; Keeton, J.T.; Miller, R.K.; Smith, S.B.; Sánchez-Plata, M.X.; Dietary lipid source and vitamin E effect on lipid oxidation stability of refrigerated fresh and cooked chicken meat, *Poultry Science.* 2010, 89(12), 2726-2734.
- [99] Decker, E.A.; Park, Y.; Healthier meat products as functional foods, *Meat Sci.* 2010, 86(1), 49-55.
- [100] Lawrie, R.A.; Ledward, D.A.; *Lawrie's meat science*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 2006.
- [101] Rogowski, B.; Meat in human nutrition, *World Rev Nutr Diet.* 1980, 34, 46-101.
- [102] Wood, J.D.; Richardson, R.I.; Nute, G.R.; Fisher, A.V.; Campo, M.M.; Kasapidou, E.; Sheard, P.R.; Enser, M.; Effects of fatty acids on meat quality: a review, *Meat Science.* 2004, 66(1), 21-32.
- [103] Directorate General for Agriculture and Rural Development, Short-term outlook for UE agricultural markets in 2017 and 2018, European Commission, 2017, 18-19.
- [104] Główny Urząd Statystyczny, Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2012, Warszawa, 2012, 821.
- [105] Kunachowicz, H.N.; Nadolna I.; Przygoda B.; *Jem zdrowo.*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2014.
- [106] Lichtenstein, A.H.; Dietary fat: a history, *Nutr Rev.* 1999, 57(1), 11-14.
- [107] Hu, F.B.; Stampfer, M.J.; Manson, J.E.; Rimm, E.; Colditz, G.A.; Rosner, B.A.; Hennekens, C.H.; Willett, W.C.; Dietary Fat Intake and the Risk of Coronary Heart Disease in Women, *New England Journal of Medicine.* 1997, 337(21), 1491-1499.
- [108] Choi, B.G.; Vilahur, G.; Yadegar, D.; Viles-Gonzalez, J.F.; Badimon, J.J.; The role of high-density lipoprotein cholesterol in the prevention and possible treatment of cardiovascular diseases, *Curr Mol Med.* 2006, 6(5), 571-587.
- [109] Michikawa, M.; The role of cholesterol in pathogenesis of Alzheimer's disease: dual metabolic interaction between amyloid beta-protein and cholesterol, *Mol Neurobiol.* 2003, 27(1), 1-12.
- [110] Christophersen, O.; Haug, A.; Animal products, diseases and drugs: a plea for better integration between agricultural sciences, human nutrition and human pharmacology, *Lipids in Health and Disease.* 2011, 10(1), 16.
- [111] Konjufca, V.H.; Pesti, G.M.; Bakalli, R.I.; Modulation of cholesterol levels in broiler meat by dietary garlic and copper, *Poult Sci.* 1997, 76(9), 1264-1271.
- [112] Lu, P.; Zhang, L.Y.; Yin, J.D.; Everts, A.K.R.; Li, D.F.; Effects of soybean oil and linseed oil on fatty acid compositions of muscle lipids and cooked pork flavour, *Meat Science.* 2008, 80(3), 910-918.
- [113] Erkkilä, A.T.; Lehto, S.; Pyörälä, K.; Uusitupa, M.I.J.; n-3 Fatty acids and 5-y risks of death and cardiovascular disease events in patients with coronary artery disease, *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2003, 78(1), 65-71.
- [114] Grynberg, A.; Hypertension prevention: from nutrients to (fortified) foods to dietary patterns. Focus on fatty acids, *J Hum Hypertens.* 2005, 19 Suppl 3, 25-33.

- [115] Galli, C.; Calder, P.C.; Effects of Fat and Fatty Acid Intake on Inflammatory and Immune Responses: A Critical Review, *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2009, 55(1-3), 123-139.
- [116] Heś, M.; Korczak, J.; Wpływ różnych czynników na szybkość utleniania się lipidów mięsa., *Nauka Przyroda Technologie*. 2007, 1(1), 3.
- [117] Mottram, D.S.; Flavour formation in meat and meat products: a review, *Food Chemistry*. 1998, 62(4), 415-424.
- [118] Kearney, J.; Food consumption trends and drivers, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010, 365(1554), 2793-2807.
- [119] Cranfield, J.A.L.; Changes in the structure of global food demand, *American Agricultural Economics Association*. 1998, 80(5), 1042-1050.
- [120] O'Keefe, S.F.; Proudfoot, F.G.; Ackman, R.G.; Lipid oxidation in meats of omega-3 fatty acid-enriched broiler chickens, *Food Research International*. 1995, 28(4), 417-424.
- [121] Ang, C.Y.W.; Young, L.L.; Wilson, R.; Interrelationships of Protein, Fat and Moisture Content of broiler Meat, *Journal of Food Science*. 1984, 49(2), 359-362.
- [122] Demby, J.H.; Cunningham, F.E.; Factors Affecting Composition of Chicken Meat. A Literature Review, *World's Poultry Science Journal*. 1980, 36(01), 25-67.
- [123] Janicki, S.; Fiebig, A.; Sznitowska, M.; *Farmacja stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2013.
- [124] Rustichelli, C.; Avallone, R.; Campioli, E.; Braghiroli, D.; Baraldi, M.; Polyunsaturated fatty acid levels in rat tissues after chronic treatment with dietetic oils, *J Sci Food Agric*. 2012, 92(2), 239-245.
- [125] Woods, V.B.; Fearon, A.M.; Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review, *Livestock Science*. 2009, 126(1-3), 1-20.
- [126] Betti, M.; Perez T.I.; Zuidhof, M.J.; Renema, R.A.; Omega-3-enriched broiler meat: 3. Fatty acid distribution between triacylglycerol and phospholipid classes, *Poult Sci*. 2009, 88(8), 1740-1754.
- [127] Gonzalez-Esquerra, R.; Leeson, S.; Effects of menhaden oil and flaxseed in broiler diets on sensory quality and lipid composition of poultry meat, *Br Poult Sci*. 2000, 41(4), 481-488.
- [128] Lopez-Ferrer, S.; Baucells, M.D.; Barroeta, A.C.; Grashorn, M.A.; n-3 enrichment of chicken meat using fish oil: alternative substitution with rapeseed and linseed oils, *Poult Sci*. 1999, 78(3), 356-365.
- [129] Sayadati, S.A.; Mirzaei-Aghsaghali, A.; Fathi H.; Davuodi, J.; Importance essential fatty acids (n-6 and n-3) in animal nutrition: II: Poultry., *Annals of Biological Research*. 2013, 3, 1177-1190.
- [130] Ferrini, G.; Manzanilla, E.G.; Menoyo, D.; Esteve-Garcia, E.; Baucells, M.D.; Barroeta, A.C.; Effects of dietary n-3 fatty acids in fat metabolism and thyroid hormone levels when compared to dietary saturated fatty acids in chickens, *Livestock Science*. 2010, 131(2), 287-291.
- [131] Dolatowski, Z.J.; Twarda, J.; Dudek, M.; Zmiany uwodnienia mięsa podczas dojrzewania, *Annales UMCS Sec. E*. 2004, 59(4), 1595-1606.
- [132] Cierach, M.; Niedźwiedź, J.; Borzyszkowski, M.; Zmiany poubojowe w wołowej tkance mięśniowej a jakość mięsa, *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 2009, 48(2), 27-28.
- [133] Kołczak, T.; Jakość wołowiny, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2008, 1(56), 5-22.
- [134] Domaradzki, P.; Skąlecki, P.; Florek, M.; Litwińczuk, Z.; Związek kolagenu z wybranymi parametrami technologicznymi mięsa cielęcego., *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2010, 4(71), 50-62.
- [135] Procnier, A.; *Technologia gastronomiczna z towaroznawstwem dla technikum cz. 1*, WSiP, Warszawa, 2000.
- [136] Xiao, S.; Zhang WG; Lee, E.J.; Ma, C.W.; Ahn, D.U.; Effects of diet, packaging, and irradiation on protein oxidation, lipid oxidation, and color of raw broiler thigh meat during refrigerated storage, *Poult Sci*. 2011, 90(6), 1348-1357.
- [137] Cichosz, G.; Oleje roślinne a zagrożenie nowotworami., *Przegląd Mleczarski*. 2008, 4, 4-12.

- [138] Murray, R. K; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W.; *Biochemia Harpera. Lipidy o znaczeniu fizjologicznym*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1995, 173-187.
- [139] Sikorski, Z.E.; Drozdowski, B.; *Lipidy. Chemia żywności sacharydy lipidy i białka*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2007, 112-140.
- [140] Logani, M.K.; Davies, R.E.; Lipid oxidation: biologic effects and antioxidants--a review, *Lipids*. 1980, 15(6), 485-495.
- [141] Kanner, J.; Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications, *Meat Sci*. 1994, 36(1-2), 169-189.
- [142] Igene, J.O.; Pearson, A.M.; Dugan, L.R.; Price, J.F.; Role of triglycerides and phospholipids on development of rancidity in model meat systems during frozen storage, *Food Chemistry*. 1980, 5(4), 263-276.
- [143] Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Domínguez, J.M.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; José Núñez, M.; Parajó, J.C.; Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*. 2001, 72(2), 145-171.
- [144] Kondratowicz, J.; Kawałko, P.; Zmiany właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych mięsa kurcząt brojlerów w zależności od metody i czasu przechowywania chłodniczego., *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2003, 4(37), 184-193.
- [145] Wenk, M.R.; The emerging field of lipidomics., *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2005, 4(7), 594-610.
- [146] Shevchenko, A.; Simons, K.; Lipidomics: coming to grips with lipid diversity, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010, 11(8), 593-598.
- [147] Vichi, S.; Pizzale, L.; Conte, L.S.; Stereospecific distribution of fatty acids in triacylglycerols of olive oils, *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2007, 109(1), 72-78.
- [148] Calvano, C.D.; De Ceglie C.; Aresta, A.; Facchini, L.A.; C.G.; Zambonin, C.G.; MALDI-TOF mass spectrometric determination of intact phospholipids as markers of illegal bovine milk adulteration of high-quality milk, *Anal Bioanal Chem*. 2013, 405(5), 1641-1649.
- [149] Dunstan, J.A.; Roper J.; Mitoulas, L.; Hartmann, P.E.; Simmer, K.; Prescott, S.L.; The effect of supplementation with fish oil during pregnancy on breast milk immunoglobulin A, soluble CD14, cytokine levels and fatty acid composition, *Clin Exp Allergy*. 2004, 34(8), 1237-1242.
- [150] Giacometti, J.; Milosevic, A.; Milin, C.; Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction, *J Chromatogr A*. 2002, 976, 47-54.
- [151] Grav, H.J.; Asiedu, D.K; Berge, R.K.; Gas chromatographic measurement of 3- and 4-thia fatty acids incorporated into various classes of rat liver lipids during feeding experiments, *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1994, 658(1), 1-10.
- [152] Nagy, K.; Courtet-Compoundu, M.C.; Holst, B.; Kussmann, M.; Comprehensive analysis of vitamin E constituents in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal Chem*. 2007, 79(18), 7087-7096.
- [153] Higashi, T.; Shibayama Y.; Fuji, M.; Shimada, K.; Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of salivary 25-hydroxyvitamin D3: a noninvasive tool for the assessment of vitamin D status, *Anal Bioanal Chem*. 2008, 391(1), 229-238.
- [154] Kelly, L.; Grehan, B.; Chiesa, A.D.; O'Mara, S.M.; Downer, E.; Sahyoun, G.; Massey, K.A.; Nicolaou, A.; Lynch, M.A.; The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat, *Neurobiol Aging*. 2011, 32(12), 2318-2315.
- [155] Niemoller, T.D.; Bazan, N.G.; Docosahexaenoic acid neurolipidomics, *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2010, 91(3-4), 85-89.
- [156] Astarita, G.; Piomelli, D.; Towards a whole-body systems [multi-organ] lipidomics in Alzheimer's disease, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011, 85(5), 197-203.
- [157] Astarita, G.; Jung, K.-M.; Berchtold, N.C.; Nguyen, V.Q.; Gillen, D.L.; Head, E.; Cotman, C.W.; Piomelli, D.; Deficient Liver Biosynthesis of Docosahexaenoic Acid Correlates with Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease, *PLoS ONE*. 2010, 5(9), 12538.
- [158] Green, P.; Anyakoha, N.; Yadid, G.; Gispan-Herman, I.; Nicolaou, A.; Arachidonic acid-containing phosphatidylcholine species are increased in selected brain regions of a

- depressive animal model: implications for pathophysiology, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009, 80(4), 213-220.
- [159] Huster, D.; Scheidt, H.A.; Arnold, K.; Herrmann, A.; Muller, P.; Desmosterol may replace cholesterol in lipid membranes, *Biophys J*. 2005, 88(3), 1838-1844.
 - [160] Zhang, J.; Campbell, R.E.; Ting, A.Y.; Tsien, R.Y.; Creating new fluorescent probes for cell biology, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002, 3(12), 906-918.
 - [161] Maier, O.; Oberle, V.; Hoekstra, D.; Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review), *Chem Phys Lipids*. 2002, 116(1-2), 3-18.
 - [162] Kuerschner, L.; Ejsing, C.S.; Ekroos, K.; Shevchenko, A.; Anderson, K.; Thiele, C.; Polyene-lipids: a new tool to image lipids, *Nature Methods*. 2005, 2, 39-45
 - [163] McIntosh, A.L.; Huang, H.; Atshaves, B.P.; Wellberg, E.; Kuklev, D.V.; Smith, W.L.; Kier, A.B.; Schroeder, F.; Fluorescent n-3 and n-6 very long chain polyunsaturated fatty acids: three-photon imaging in living cells expressing liver fatty acid-binding protein, *J Biol Chem*. 2010, 285(24), 18693-18708.
 - [164] Sukhija, P.S.; Palmquist, D.L.; Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces, *J. Agric. Food Chem*. 1988, 36(6), 1202-1206.
 - [165] Ishitsuka, R.; Yamaji-Hasegawa, A.; Makino, A.; Hirabayashi, Y.; Kobayashi, T.; A lipid-specific toxin reveals heterogeneity of sphingomyelin-containing membranes, *Biophys J*. 2004, 86(1), 296-307.
 - [166] Lehmann, C.; *Interaction of radiation with solids and elementary defect production.*, North-Holland Publishing Company, Netherlands, 1977.
 - [167] Vickerman, J.C.; Gilmore, I.S.; *Surface Analysis. The Principal Techniques*, John Wiley & Sons, Singapur, 2009.
 - [168] Benninghoven, A.; Rüdenauer, F.G.; Werner, H.W.; *Secondary ion mass spectrometry: basic concepts, instrumental aspects, applications and trends*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
 - [169] Bohr, N.; The Penetration of Atomic Particles Through Matter, *Dan. Vid. Selsk. Mat. Fys. Medd*. 1948, 18(8).
 - [170] Lindhard, J.N.; Vibeke; Scharff, M.; Approximation method in classical scattering by screened Coulomb fields, *Matematisk-fysiske meddelelser*. 1968, 36(10), 31-32.
 - [171] Lindhard, J.N.; Vibeke; Scharff, M.; Thomsen, P.V.; Integral equations governing radiation effects (notes on atomic collisions, III), *Matematisk-fysiske Meddelelser udgivet af Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskab*. 1963, 33(10).
 - [172] Sigmund, P.; Theory of Sputtering. I. Sputtering Yield of Amorphous and Polycrystalline Targets, *Physical Review*. 1969, 184(2), 383-416.
 - [173] Johnson, R.E.; *Energetic Charged-Particle Interactions with Atmospheres and Surfaces*, Physics and Chemistry in Space 19 Planetology, Springer-Verlag, Berlin, 1990.
 - [174] Schou, J.; Ion energy dissipation and sputtering during bombardment of multicomponent materials., NATO-ASI meeting on „Structure-Property Relationships in Ion-Beam Surface-Motified Ceramics-Theory and Practice.”, Il Ciocco, Italy, 1988.
 - [175] Vickerman, J.C.; Briggs, D.; *ToF-SIMS: Surface Analysis by Mass Spectrometry 2nd Edition*, IM Publications LLP and Surface Spectra Limited, Manchester, UK, 2013.
 - [176] Van Vaeck, L.; Adriaens, A.; Gijbels, R.; Static secondary ion mass spectrometry (S-SIMS) Part 1: methodology and structural interpretation, *Mass Spectrometry Reviews*. 1999, 18(1), 1-47.
 - [177] Paruch, R.J.; Garrison, B.J.; Postawa, Z.; Computed molecular depth profile for C₆₀ bombardment of a molecular solid, *Anal. Chem*. 2013, 85 (23), 11628-11633.
 - [178] Paruch, R.; Rzeznik, L.; Russo, M.F.; Garrison, B.J.; Postawa, Z.; Molecular Dynamics Study of the Effect of Surface Topography on Sputtering Induced by 20 keV Au₃ and C₆₀ Clusters, *The Journal of Physical Chemistry C* 2010, 114(12), 5532-5539.
 - [179] Rzeznik, L.; Czerwinski, B.; Garrison, B.J.; Winograd, N.; Postawa, Z.; Molecular dynamics simulations of sputtering of organic overlayers by slow, large clusters, *Applied Surface Science*. 2008, 255(4), 841-843.

- [180] Garrison, B.J.; Postawa, Z.; Computational view of surface based organic mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*. 2008, 27(4), 289-315.
- [181] Le Beyec, Y.; Cluster impacts at keV and MeV energies: Secondary emission phenomena, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1998, 174(1-3), 101-117.
- [182] Grams, J.; *New Trends and Potentialities of ToF-SIMS in Surface Studies*, Nova Science Publishers, New York, 2007.
- [183] Appelhans, A.D.; Delmore, J.E.; Comparison of polyatomic and atomic primary beams for secondary ion mass spectrometry of organics, *Analytical Chemistry*. 1989, 61(10), 1087-1093.
- [184] Weibel, D.; Wong, S.; Lockyer, N.; Blenkinsopp, P.; Hill, R.; Vickerman, J.C.; A C₆₀ Primary Ion Beam System for Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: Its Development and Secondary Ion Yield Characteristics, *Analytical Chemistry*. 2003, 75(7), 1754-1764.
- [185] Kollmer, F.; Cluster primary ion bombardment of organic materials, *Applied Surface Science*. 2004, 231-232, 153-158.
- [186] Touboul, D.; Halgand, F.; Brunelle, A.; Kersting, R.; Tallarek, E.; Hagenhoff, B.; Lapr v te, O.; Tissue Molecular Ion Imaging by Gold Cluster Ion Bombardment, *Analytical Chemistry*. 2004, 76(6), 1550-1559.
- [187] Fletcher, J.S.; Lockyer, N.P.; Vaidyanathan, S.; Vickerman, J.C.; TOF-SIMS 3D Biomolecular Imaging of *Xenopus laevis* Oocytes Using Buckminsterfullerene (C₆₀) Primary Ions, *Analytical Chemistry*. 2007, 79(6), 2199-2206.
- [188] Weibel, D.; Wong, S.; Lockyer, N.; Blenkinsopp, P.; Hill, R.; Vickerman, J.C.; A C₆₀ primary ion beam system for time of flight secondary ion mass spectrometry: its development and secondary ion yield characteristics, *Anal. Chem.* 2003, 75 (7), 1754-1764.
- [189] Ekman, R.; Silberring, J.; Westman-Brinkmalm, A.M.; Kraj, A.; *Mass spectrometry. Instrumentation, Interpretation and Applications*, John Wiley & Sons, Canada, 2009.
- [190] Suder, P.; Silberring, J.; *Spektrometria mas*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2006.
- [191] Hoffman, E.; Charette, J.; Stroobant, V.; *Spektrometria mas*, Wydawnictwo Naukowe – Techniczne, Warszawa, 1998.
- [192] Cotter, R.J.; *Time-of-Flight Mass Spectrometry. Instrumentation and Applications in Biological Research*, ACS Professional Reference Books, Washington, 1997.
- [193] Wu, L.; Felton, J.S.; Wu, K.J.; Applying imaging ToF-SIMS and PCA in differentiation of tissue types, *Methods Mol Biol.* 2010, 656, 267-281
- [194] Lazof, D.B.; Goldsmith, J.K.G.; Rufty, T.W.; Suggs, C.; Linton, R.W.; The preparation of cryosections from plant tissue: An alternative method appropriate for secondary ion mass spectrometry studies of nutrient tracers and trace metals, *Journal of Microscopy*. 1994, 176(2), 99-109.
- [195] Pacholski, M.L.; Winograd, N.; Imaging with mass spectrometry, *Chem Rev.* 1999, 99(10), 2977-3006.
- [196] Clerc, J.; Fourre, C.; Fragu, P.; SIMS microscopy: methodology, problems and perspectives in mapping drugs and nuclear medicine compounds, *Cell Biol Int.* 1997, 21(10), 619-633
- [197] Echlin, P.; *Low Temperature Microscopy and Analysis.*, Plenum Press, New York, USA, 1992.
- [198] Kurczy, M.E.; Piehowski, P.D.; Parry, S.A.; Jiang, M.; Chen, G.; Ewing, A.G.; Winograd, N.; Which is more important in bioimaging SIMS experiments-The sample preparation or the nature of the projectile?, *Appl Surf Sci.* 2008, 255(4), 1298-1304
- [199] Pacholski, M.L.; Cannon D.M. Jr.; Ewing, A.G.; Winograd, N.; Static time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging of freeze-fractured, frozen-hydrated biological membranes, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1998, 12(18), 1232-1235.
- [200] Chandra, S.; Bernius, M.T.; Morrison, G.H.; Intracellular localization of diffusible elements in frozen-hydrated biological specimens with ion microscopy, *Analytical Chemistry*. 1986, 58(2), 493-496.
- [201] Fletcher, J.S.; Rabbani, S.; Henderson, A.; Lockyer, N.P.; Vickerman, J.C.; Three-dimensional mass spectral imaging of HeLa-M cells – sample preparation, data interpretation and visualization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011, 25(7), 925-932.

- [202] Roddy, T.P.; Cannon D.M. Jr.; Ostrowski, S.G.; Ewing, A.G.; Winograd, N.; Proton transfer in time-of-flight secondary ion mass spectrometry studies of frozen-hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine, *Anal Chem.* 2003, 75(16), 4087-94.
- [203] Ostrowski, S.G.; Van Bell, C.T.; Winograd, N.; Ewing, A.G.; Mass spectrometric imaging of highly curved membranes during Tetrahymena mating, *Science.* 2004, 305(5680), 71-73.
- [204] Sjövall, P.; Johansson, B.; Lausmaa, J.; Localization of lipids in freeze-dried mouse brain sections by imaging TOF-SIMS, *Applied Surface Science.* 2006, 252(19), 6966-6974.
- [205] Debois, D.; Brunelle, A.; Laprévote, O.; Attempts for molecular depth profiling directly on a rat brain tissue section using fullerene and bismuth cluster ion beams, *International Journal of Mass Spectrometry.* 2007, 260(2-3), 115-120.
- [206] Delcorte, A.; Bour, J.; Aubriet, F.; Muller, J.F.; Bertrand, P.; Sample Metallization for Performance Improvement in Desorption/Ionization of Kilodalton Molecules: Quantitative Evaluation, Imaging Secondary Ion MS, and Laser Ablation, *Analytical Chemistry.* 2003, 75(24), 6875-6885.
- [207] Nygren, H.; Malmberg, P.; Kriegeskotte, C.; Arlinghaus, H.F.; Bioimaging TOF-SIMS: localization of cholesterol in rat kidney sections, *FEBS Lett.* 2004, 566(1-3), 291-293.
- [208] Park, J.-W.; Min, H.; Kim, Y.-P.; Kyong Shon, H.; Kim, J.; Moon, D.W.; Lee, T.G.; Multivariate analysis of ToF-SIMS data for biological applications, *Surface and Interface Analysis.* 2009, 41(8), 694-703.
- [209] Smentkowski, V.S.; Ostrowski, S.G.; Keenan, M.R.; A comparison of multivariate statistical analysis protocols for ToF-SIMS spectral images, *Surface and Interface Analysis.* 2009, 41(2), 88-96.
- [210] Touboul, D.; Laprevote, O.; Brunelle, A.; Micrometric molecular histology of lipids by mass spectrometry imaging, *Current Opinion in Chemical Biology.* 2011, 15(5), 725-732.
- [211] Touboul, D.; Brunelle, A.; Halgand, F.; De La Porte, S.; Laprevote, O.; Lipid imaging by gold cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry: application to Duchenne muscular dystrophy, *J Lipid Res.* 2005, 46(7), 1388-1395.
- [212] Debois, D.; Bralet, M.P.; Le Naour, F.; Brunelle, A.; Laprevote, O.; In situ lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver by cluster TOF-SIMS imaging, *Anal. Chem.* 2009, 81 (8), 2823-2831.
- [213] Malmberg, P.; Jennische, E.; Nilsson, D.; Nygren, H.; High-resolution, imaging TOF-SIMS: novel applications in medical research, *Anal Bioanal Chem.* 2011, 399(8), 2711-2718.
- [214] Tahallah, N.; Brunelle, A.; De La Porte, S.; Laprevote, O.; Lipid mapping in human dystrophic muscle by cluster-time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging, *J Lipid Res.* 2008, 49(2), 438-454.
- [215] Kamys, B.; Analiza wariancji (ANOVA) - klasyfikacja jednoczynnikowa, Statystyczne metody opracowania pomiarów, 2007/08, http://users.uj.edu.pl/~ufkamys/BK/bb_zakladki.pdf, str. 99-103; [15.02.2018].
- [216] Touboul, D.; Brunelle, O.; Laprevote, O.; Mass spectrometry imaging: Towards a lipid microscope?, *Biochimie.* 2011, 93(1), 113-119.
- [217] Brunelle, A.; Laprevote, O.; Lipid imaging with cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.* 2009, 393(1), 31-35.
- [218] McMahon, J.M.; Short, R.T.; McCandlish, C.A.; Brenna, J.T.; Todd, P.J.; Identification and mapping of phosphocholine in animal tissue by static secondary ion mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1996, 10(3), 335-340.
- [219] Seedorf, U.; Fobker, M.; Voss, R.; Meyer, K.; Kannenberg, F.; Meschede, D.; Ullrich, K.; Horst, J.; Benninghoven, A.; Assmann, G.; Smith-Lemli-Opitz syndrome diagnosed by using time-of-flight secondary-ion mass spectrometry, *Clin Chem.* 1995, 41(4), 548-552.
- [220] Börner, K.; Malmberg, P.; Månsson, J.-E.; Nygren, H.; Molecular imaging of lipids in cells and tissues, *International Journal of Mass Spectrometry.* 2007, 260(2-3), 128-136.
- [221] Touboul, D.; Roy, S.; Germain, D.P.; Chaminade, P.; Brunelle, A.; Laprévote, O.; MALDI-TOF and cluster-TOF-SIMS imaging of Fabry disease biomarkers, *International Journal of Mass Spectrometry.* 2007, 260(2-3), 158-165.
- [222] Nygren, H.; Börner, K.; Hagenhoff, B.; Malmberg, P.; Månsson, J.E.; Localization of cholesterol, phosphocholine and galactosylceramide in rat cerebellar cortex with imaging

- TOF-SIMS equipped with a bismuth cluster ion source, *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1737(2-3), 102-110.
- [223] Sjoval, P.; Lausmaa, J.; Nygren, H.; Carlsson, L.; Malmberg, P.; Imaging of membrane lipids in single cells by imprint-imaging time-of-flight secondary ion mass spectrometry, *Anal Chem*. 2003, 75(14), 3429-3434.
- [224] Nygren, H.; Malmberg, P.; Silver deposition on freeze-dried cells allows subcellular localization of cholesterol with imaging TOF-SIMS, *J Microsc*. 2004, 215(Pt 2), 156-161.
- [225] Prinz, C.; Hook, F.; Malm, J.; Sjoval, P.; Structural effects in the analysis of supported lipid bilayers by time-of-flight secondary ion mass spectrometry, *Langmuir*. 2007, 23 (15), 8035-8041.
- [226] Ostrowski, S.G.; Kurczy, M.E.; Roddy, T.P.; Winograd, N.; Ewing, A.G.; Secondary ion MS imaging to relatively quantify cholesterol in the membranes of individual cells from differentially treated populations, *Anal Chem*. 2007, 79(10), 3554-3560.
- [227] Touboul, D.; Kollmer, F.; Niehuis, E.; Brunelle, A.; Laprevote, O.; Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source, *J Am Soc Mass Spectrom*. 2005, 16(10), 1608-1618.
- [228] Monroe, E.B.; Jurchen, J.C.; Lee, J.; Rubakhin, S.S.; Sweedler, J.V.; Vitamin E imaging and localization in the neuronal membrane, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127 (35), 12152-12153.
- [229] Amemiya, T.; Tozu, M.; Ohashi, Y.; Time-of-flight secondary ion mass spectrometry can replace histochemistry demonstration of fatty acids in the retina, *Jpn J Ophthalmol*. 2004, 48(3), 287-293.
- [230] Mas, S.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Aragoncillo, P.; Egido, J.; Laprevote, O.; Vivanco, F.; Lipid cartography of atherosclerotic plaque by cluster-TOF-SIMS imaging, *Analyst*. 2007, 132(1), 24-26.
- [231] Malmberg, P.; Nygren, H.; Richter, K.; Chen, Y.; Dangardt, F.; Friberg, P.; Magnusson, Y.; Imaging of lipids in human adipose tissue by cluster ion TOF-SIMS, *Microsc Res Tech*. 2007, 70(9), 828-835.
- [232] Todd, P.J.; Schaaff, T.G.; Chaurand, P.; Caprioli, R.M.; Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization, *Journal of Mass Spectrometry*. 2001, 36(4), 355-369.
- [233] Zawistowski, S.; *Technika histologiczna, histologia oraz podstawy histologii.*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1970.
- [234] Brunelle, A.; Touboul, D.; Laprevote, O.; Biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion sources, *J Mass Spec*. 2005, 40(8), 985-999.
- [235] Jones, E.A.; Lockyer, N.P.; Vickerman, J.C.; Depth Profiling Brain Tissue Sections with a 40 keV C₆₀⁺ Primary Ion Beam, *Analytical Chemistry*. 2008, 80(6), 2125-2132.
- [236] Chandra, S.; Challenges of biological sample preparation for SIMS imaging of elements and molecules at subcellular resolution, *Applied Surface Science*. 2008, 255(4), 1273-1284.
- [237] Arlinghaus, H.F.; Kriegeskotte, C.; Fartmann, M.; Wittig, A.; Sauerwein, W.; Lipinsky, D.; Mass spectrometric characterization of elements and molecules in cell cultures and tissues, *Applied Surface Science*. 2006, 252(19), 6941-6948.
- [238] Malm, J.; Giannaras, D.; Riehle, M.O.; Gadegaard, N.; Sjöval, P.; Fixation and Drying Protocols for the Preparation of Cell Samples for Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis, *Analytical Chemistry*. 2009, 81(17), 7197-7205.
- [239] Green, F.M.; Gilmore, I.S.; Seah, M.P.; TOF-SIMS: Accurate Mass Scale Calibration, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2006, 17(4), 514-523.
- [240] Jing, M.; Gakhar, N.; Gibson, R.A.; House, J.D.; Dietary and ontogenic regulation of fatty acid desaturase and elongase expression in broiler chickens, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2013, 89(2-3), 107-113.
- [241] Kowalska, D.; Bielański, P.; Chełmińska, A.; Wpływ dodatku do paszy oleju lnianego i rybnego na profil kwasów tłuszczowych i utlenienie tłuszczu śródmięśniowego królików., *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2011, 2(75), 148-159.

- [242] Rondelli, S.G.; Martinez, O.; García, P.T.; Effects of different dietary lipids on the fatty acid composition of broiler abdominal fat, *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 2004, 6, 171-175.
- [243] Osek, M.; Wasiłowski, Z.; Janocha, A.; Wpływ różnych olejów roślinnych na skład podstawowy i profil kwasów tłuszczowych mięsa kurcząt brojlerów., *Rocz. Nauk. Zoot.* 2004, 20, 235-238.
- [244] Rutkowska, J.; Żbikowska, A.; Jakość wybranych olejów roślinnych dostępnych na polskim rynku., *PZH*. 2007, 58(3), 515-524.
- [245] Goodnight, S.H.; The effects of n-3 fatty acids on atherosclerosis and the vascular response to injury, *Arch Pathol Lab Med*. 1993, 117(1), 102-106
- [246] Migdał, W.; Pieszka, M.; Barowicz, T.; Janik, A.; Wojtysiak, D.; Pustowiak, H.; Nowak, J.; Kozioł, A.; Modyfikowanie profili kwasów tłuszczowych mięsa zwierząt rzeźnych - za i przeciw., *Rocznik Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego*. 2008, 46(1), 111-123.
- [247] Ladikos, D.; Lougovois, D.; Lipid oxidation in muscle foods: A review., *Food Chem*. 1990, 35, 295-314.
- [248] Pisulewski, P.M.; Nutritional potential for improving meat quality in poultry., *Anim. Sci. Papers and Reports*. 2005, 23(4), 303-3015.
- [249] Francois, C.A.; Connor S.L., Wander, R.C.; Connor, W.E.; Acute effects of dietary fatty acids on the fatty acids of human milk, *Am J Clin Nutr*. 1998, 67(2), 301-308.
- [250] Zock, P.L.; de Vries, J.H.; Katan, M.B.; Impact of myristic acid versus palmitic acid on serum lipid and lipoprotein levels in healthy women and men, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994, 14(4), 567-575.
- [251] Wood, J.; Senthilmohan, S.; Peskin, A.; Antioxidant activity of procyanidin-containing oilplant extracts at different pHs, *Food Chemistry*. 2013, 77(2), 155-161.
- [252] Karłowicz-Bodalska, K.; Bodalski, T.; Nienasycone kwasy tłuszczowe, ich właściwości biologiczne i znaczenie w lecznictwie., *Postępy fitoterapii*. 2007, 1, 46-56.
- [253] Rule, D.C.; Broughton, K.S.; Shellito, S.M.; Maiorano, G.; Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk, and chicken, *J Anim Sci*. 2002, 80(5), 1202-1211.
- [254] de Almeida, J.C.; Perassolo, M.S.; Camargo, J.L.; Bragagnolo, N.; Gross, J.L.; Fatty acid composition and cholesterol content of beef and chicken meat in Southern Brazil, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2006, 42, 109-117.
- [255] Kromhout, D.; Dietary Fats: Long-Term Implications for Health, *Nutrition Review*. 1992, 50(4), 49-53.
- [256] Connor, W.E.; Importance of n-3 fatty acids in health and disease, *Am J Clin Nutr*. 2000, 71(1 Suppl), 171-175.
- [257] Leitzmann, M.F.; Stampfer M.J.; Michaud, D.S.; Augustsson, K.; Colditz, G.C.; Willett, W.C.; Giovannucci, E.L.; Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer, *Am J Clin Nutr*. 2004, 80(1), 204-216.
- [258] Fortin, P.R.; Lew R.A.; Liang, M.H.; Wright, E.A.; Beckett, L.A.; Chalmers, T.C.; Sperling, R.I.; Validation of a meta-analysis: the effects of fish oil in rheumatoid arthritis, *J Clin Epidemiol*. 1995, 48(11), 1379-1390.
- [259] Simopoulos, A.P.; The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases, *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008, 233(6), 674-688.
- [260] Sawada, N.; Inoue, M.; Iwasaki, M.; Sasazuki, S.; Shimazu, T.; Yamaji, T.; Takachi, R.; Tanaka, Y.; Mizokami, M.; Tsugane, S.; Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*. 2012, 142(7), 1468-1475.
- [261] Kolanowski, W.; Świdorski, F.; Wielonienasycone kwasy tłuszczowe z grupy n-3 (n-3 PUFA), korzystne działanie zdrowotne, zalecenia spożycia, wzbogacanie żywności., *Żywnie Człowieka i Metabolizm*. 1997, 24(2), 49-62.
- [262] Marciniak-Łukasiak, K.; Krygier, K.; Charakterystyka kwasów omega 3 i ich zastosowanie w żywności funkcjonalnej, *Przemysł Spożywczy*. 2004, 58(12), 32-36.

- [263] Gomez Candela, C.; Bermejo Lopez, L.M.; Loria Kohen, V.; Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations, *Nutr Hosp.* 2011, 26(2), 323-329.
- [264] Fundation, B.N.; *Unsaturated fatty acid: nutritional and physiological significance*. Task Force report., London, 1992.
- [265] Radu-Rusu, R.M.; Vacaru-Opris, I.; Usturoi, M.; Contributions on the nutritional value knowledge for the meat produced by ROSS-308 chicken hybrid., *Lucrari Stiintifice*. 2010, 53, 257-261.
- [266] Pieszka, M.; Janik, A.; Wpływ stabilności oksydacyjnej lipidów na wartość dietetyczną wieprzowiny., *Wiad. Zoot.* 2005, 43(4), 37-40.
- [267] Shin, D.; Choi, S.H.; Go, G.; Park, J.H.; Narciso-Gaytan, C.; Morgan, C.A.; Smith, S.B.; Sanchez-Plata, M.X.; Ruiz-Feria, C.A.; Effects of dietary combination of n-3 and n-9 fatty acids on the deposition of linoleic and arachidonic acid in broiler chicken meats, *Poult Sci.* 2012, 91(4), 1009-1017.
- [268] Haug, A.; Eich-Greatorex, S.; Bernhoft, A.; Wold, J.P.; Hetland, H.; Christophersen, O.A.; Sogn, T.; Effect of dietary selenium and omega-3 fatty acids on muscle composition and quality in broilers, *Lipids in Health and Disease*. 2007, 6, 29-29.
- [269] Kralik, G.; Primorac, L.; Kralik, Z.; Hrehor, B.; Effect of dietary fat sources on the fatty acid compositions and sensory characteristics of chicken meat., *J. of Food Sci. and Engineering*. 2012, 2, 667-673.
- [270] Sjoval, P.; Lausmaa, J.; Johansson, B.; Mass spectrometric imaging of lipids in brain tissue, *Anal Chem.* 2004, 76(15), 4271-4278.
- [271] Barteczko, J.; Borowiec, F.; Migdał, W.; Efektywność żywienia brojlerów mieszankami z udziałem nasion różnych genotypów lnu oleistego., *Rośliny oleiste - oilseed crops*. 2001, 22(1), 173-181.
- [272] Barteczko, J.; Kamiński, J.; The effect of standarized dietary fats on body lipids and cholesterol fractions in plasma of broiler chickens., *10th Europ. Symp. on Poultry Nutr., World Poultry Sci. Assoc., Turkey*. 1995, 33-36.
- [273] Niemiec, J.; Stępińska, M.; Świerczewska, E.; Riedel, J.; Kakowska, R.; Wpływ żywienia niosek mieszankami zawierającymi nasiona roślin oleistych na wyniki produkcyjne i jakość jaj., *Rośliny Oleiste*. 1999, 20(1), 305-310.
- [274] Kullenberg, D.; Taylor, L.A.; Schneider, M.; Massing, U.; Health effects of dietary phospholipids, *Lipids Health Dis.* 2012, 5, 11:3.
- [275] Liu, J.; Ma, D.W.; The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of breast cancer, *Nutrients*. 2014, 6(11), 5184-5223.
- [276] Li, Y.C.; Park, M.J.; Ye, C.W.; Kim, C.W.; Kim, Y.N.; Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents, *Am J Pathol.* 2006, 168(4), 1107-1118.
- [277] Rivnay, T.; Orbital-Harel, T.; Shinitzky, M.; Globerson, A.; Enhancement of the response of ageing mouse lymphocytes by in vitro treatment with lecithin, *Mech Ageing Dev.* 1983, 23(3-4), 329-336.
- [278] Cohn, J.S.; Wat, E.; Kamili, A.; Tandy, S.; Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease, *Curr Opin Lipidol.* 2008, 19(3), 257-262.
- [279] Kowalska, D.; Bielański, P.; Chełmińska, A.; Wpływ dodatku do paszy oleju lnianego i rybnego na profil kwasów tłuszczowych i utlenianie tłuszczu śródmięśniowego królików., *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2011, 2(75), 148-159.
- [280] Muller, H.; Grande, T.; Ahlstrom, O.; Skrede, A.; A diet rich in phosphatidylethanolamine increases plasma homocysteine in mink: a comparison with a soybean oil diet, *Br J Nutr.* 2005, 94(5), 684-690.
- [281] Eros, G.; Varga, G.; Varadi, R.; Czobel, M.; Kaszaki, J.; Ghyczy, M.; Boros, M.; Anti-inflammatory action of a phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and N-acylphosphatidylethanolamine-enriched diet in carrageenan-induced pleurisy, *Eur Surg Res.* 2009, 42(1), 40-48.

- [282] Shirouchi, B.; Nagao, K.; Inoue, N.; Furuya, K.; Koga, S.; Matsumoto, H.; Yanagita, T.; Dietary phosphatidylinositol prevents the development of nonalcoholic fatty liver disease in Zucker (fa/fa) rats, *J Agric Food Chem.* 2008, 56(7), 2375-2379.
- [283] Fridriksson, E.K.; Shipkova, P.A.; Sheets, E.D.; Holowka, D.; Baird, B.; McLafferty, F.W.; Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry, *Biochemistry.* 1999, 38(25), 8056-8063.
- [284] Gault, C.R.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A.; An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown, *Adv Exp Med Biol.* 2010; 688, 1-23.
- [285] Duan, R.D.; Physiological functions and clinical implications of sphingolipids in the gut, *J Dig Dis.* 2011, 12(2), 60-70.
- [286] Duan, R.D.; Nilsson, A.; Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development, *Prog Lipid Res.* 2009, 48(1), 62-72.
- [287] Danielsen, E.M.; Hansen, G.H.; Lipid raft organization and function in brush borders of epithelial cells, *Mol Membr Biol.* 2006, 23(1), 71-79.
- [288] Riboni, L.; Viani, P.; Bassi, R.; Prinetti, A.; Tettamanti, G.; The role of sphingolipids in the process of signal transduction, *Prog Lipid Res.* 1997, 36(2-3), 153-195.
- [289] Modrak, D.E.; Gold, D.V.; Goldenberg, D.M.; Sphingolipid targets in cancer therapy, *Mol Cancer Ther.* 2006, 5(2), 200-208.
- [290] Ogretmen, B.; Hannun, Y.A.; Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment, *Nat Rev Cancer.* 2004, 4(8), 604-616.
- [291] Modrak, D.E.; Leon, E.; Goldenberg, D.M.; Gold, D.V.; Ceramide regulates gemcitabine-induced senescence and apoptosis in human pancreatic cancer cell lines, *Mol Cancer Res.* 2009, 7(6), 890-896.
- [292] Finck, B.N.; Han, X.; Courtois, M.; Aimond, F.; Nerbonne, J.M.; Kovacs, A.; Gross, R.W.; Kelly, D.P.; A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100(3), 1226-1231.
- [293] Sugawara, T.; Kinoshita, M.; Ohnishi, M.; Nagata, J.; Saito, M.; Digestion of maize sphingolipids in rats and uptake of sphingadienine by Caco-2 cells, *J Nutr.* 2003, 133(9), 2777-2782.
- [294] Ohlsson, L.; Hertvig, E.; Jönsson, B.A.G.; Duan, R.-D.; Nyberg, L.; Svernlöv, R.; Nilsson, Å.; Sphingolipids in human ileostomy content after meals containing milk sphingomyelin, *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2010, 91(3), 672-678.
- [295] Brisson, G.J.; *Dietary fat and human health*, Butterworths, Boston, 1986.
- [296] Ziemiański, Ś.; Tłuszcze w żywieniu człowieka - nowe koncepcje i zalecenia., *Przemysł Spożywczy.* 1996, 10, 10-12.
- [297] Xiccato, G.; Trocino, A.; Role of dietary lipid on digestive physiology, immune system and growth in rabbits., *Agriculture and Biotechnology.* 2003, 48-57.
- [298] Barowicz, T.; Wieprzowina bez cholesterolu., *Trzoda Chlewna.* 2001, 3, 50-51.
- [299] Nyquist, N.F.; Rødbotten, R.; Thomassen, M.; Haug, A.; Chicken meat nutritional value when feeding red palm oil, palm oil or rendered animal fat in combinations with linseed oil, rapeseed oil and two levels of selenium, *Lipids in Health and Disease.* 2013, 12, 69-69.
- [300] Abdulla, N.R.; Loh, T.C.; Akit, H.; Sazili, A.Q.; Foo, H.L.; Mohamad, R.; Abdul Rahim, R.; Ebrahimi, M.; Sabow, A.B.; Fatty acid profile, cholesterol and oxidative status in broiler chicken breast muscle fed different dietary oil sources and calcium levels, *South African Journal of Animal Science.* 2015, 45, 153-163.
- [301] Grabowski, T.; Kijowski, J.; *Technologia przetworów drobiowych.*, w *Mięso i przetwory drobiowe.* Technologia, higiena, jakość, Warszawa, 2004, 280.
- [302] Barowicz, T.; Wpływ żywienia na zawartość cholesterolu w mięsie tuczników., *Biuletyn Informacyjny IŻ.* 2000, 38(3), 35-43.
- [303] Jung, S.; Choe, J.H.; Kim, B.; Yun, H.; Kruk, Z.A.; Jo, C.; Effect of dietary mixture of gallic acid and linoleic acid on antioxidative potential and quality of breast meat from broilers, *Meat Sci.* 2010, 86(2), 520-526.

- [304] Rosołowska-Huszcz, D.; *Dlaczego olej rzepakowy?*, 2010, http://docenolejrzepakowy.pl/wp-content/uploads/2010/04/Raport_Dlaczego-olej-rzepakowy_.pdf. [16.02.2018]
- [305] Siemieniuk, E.; Skrzydlewska, E.; Koenzym Q10 - biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka., *Postępy Hig Med Dosw.* 2005, 59, 150-159.
- [306] Brenes, A.; Viveros, A.; Goni, I.; Centeno, C.; Sayago-Ayerdy, S.G.; Arija, I.; Saura-Calixto, F.; Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens, *Poult Sci.* 2008, 87(2), 307-316.
- [307] Smet, K.; Raes, K.; Huyghebaert, G.; Haak, L.; Arnouts, S.; De Smet, S.; Lipid and protein oxidation of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation, *Poult Sci.* 2008, 87(8), 1682-1688.
- [308] Maraschiello, C.; Esteve, E.; Garcia Regueiro, J.A.; Cholesterol oxidation in meat from chickens fed alpha-tocopherol- and beta-carotene-supplemented diets with different unsaturation grades, *Lipids.* 1998, 33(7), 705-713.
- [309] Grau, A.; Codony, R.; Grimpa, S.; Baucells, M.D.; Guardiola, F.; Cholesterol oxidation in frozen dark chicken meat: influence of dietary fat source, and alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation, *Meat Sci.* 2001, 57(2), 197-208.
- [310] Morrissey, P.A.; Sheehy, P.J.A.; Galvin, K.; Kerry, J.P.; Buckley, D.J.; Lipid stability in meat and meat products, *Meat Science.* 1998, 49, 73-86.
- [311] Kitessa, S.M.; Young, P.; Echium oil is better than rapeseed oil in enriching poultry meat with n-3 polyunsaturated fatty acids, including eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid, *Br J Nutr.* 2009, 101(5), 709-715.
- [312] Wheatley, R.A.; Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation, *Trends in Analytical Chemistry.* 2000, 19(10), 617-628.
- [313] Drozdowski, B.; Sikorski, Z.E. (Ed.); *Chemia żywności*, Wydawnictwo WNT, Warszawa, 2002, 171-228.
- [314] Pikul, J.; *Chemiczna ocena jakości lipidów mięsa drobiu., Ocena technologiczna surowców i produktów przemysłu drobiarskiego.*, AR, Poznań, 1993, str. 104-118.
- [315] Cortinas, L.; Barroeta, A.; Villaverde, C.; Galobart, J.; Guardiola, F.; Baucells, M.D.; Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: lipid oxidation, *Poult Sci.* 2005, 84(1), 48-55.
- [316] Pikul, J.; Utlenianie lipidów i powstawanie obcego zapachu i smaku w ogrzewanym i przechowywanym mięsie., *Gospodarka Mięsna.* 1992, 7, 20-23.
- [317] Ladikos, D.; Lougovois, V.; Lipid oxidation in muscle foods: A review, *Food Chemistry.* 1990, 35(4), 295-314.
- [318] Min, B.; Ahn, D.U.; Mechanism of lipid Peroxidation in Meat and Meat Products - a review, *Food Science and Biotechnology.* 2006, 14(1), 152-163.
- [319] Gašperlin, L.; Polak, T.; Rajar, A.; Skvarea, M.; Zlender, B.; Effect of genotype, age at slaughter and sex on chemical composition and sensory profile of rabbit meat, *World Rabbit Science.* 2006, 14(3), 157-166.
- [320] Fellenberg, M.A.; Speisky, H.; Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability, *World's Poultry Science Journal.* 2007, 62(1), 53-70.
- [321] Andres, A.I.; Cava, R.; Mayoral, A.I.; Tejeda, J.F.; Morcuende, D.; Ruiz, J.; Oxidative stability and fatty acid composition of pig muscles as affected by rearing system, crossbreeding and metabolic type of muscle fibre, *Meat Sci.* 2001, 59(1), 39-47.
- [322] Matthews, K.R.; Homer, D.B.; Thies, F.; Calder, P.C.; Effect of whole linseed (*Linum usitatissimum*) in the diet of finishing pigs on growth performance and on the quality and fatty acid composition of various tissues, *Br J Nutr.* 2000, 83(6), 637-643.
- [323] Płatek, T.; Metoda określania stabilności oksydatywnej olejów i tłuszczów metodą Rancimat., *Tłuszcze Jadalne.* 1995, 30(1), 25-34.
- [324] Małecka, M.; Składniki frakcji nietriacyloglicerolowej olejów roślinnych jako przeciwutleniacze., *Tłuszcze Jadalne.* 1995, 30(3), 123-130.
- [325] Pikul, J.; *Powstawanie obcego, niepożądanego zapachu i smaku w mięsie ogrzewanym i przechowywanym w warunkach chłodniczych.*, PTTŻ - Oddział Wielkopolski, Poznań, 1991.

- [326] Pikul, J.; Kummerow, F.A.; Relative Role of Individual Phospholipids on Thiobarbituric Acid Reactive Substances Formation in Chicken Meat, Skin and Swine Aorta, *Journal of Food Science*. 1990, 55(5), 1243-1248.
- [327] Chwastowska-Siwiecka, I.; Kondratowicz, J.; Effect of deep-freeze storage time and thawing method on intramuscular lipids oxidation and sensory quality of pork loin, *Pol J Vet Sci*. 2008, 11(2), 113-117.
- [328] Adams, J.; Ann, Q.; Structure determination of sphingolipids by mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*. 1993, 12(1), 51-85.
- [329] McNamara, D.J.; Dietary cholesterol and atherosclerosis, *Biochim Biophys Acta*. 2000, 1529(1-3), 310-320.
- [330] Staprans, I.; Pan, X.M.; Rapp, J.H.; Grunfeld, C.; Feingold, K.R.; Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL receptor- and apolipoprotein E-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000, 20(3), 708-714.
- [331] Linseisen, J.; Wolfram, G.; Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans, *Ann Nutr Metab*. 1998, 42(4), 221-230.
- [332] Vejux, A.; Malvitte, G.; Lizard, G.; Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis, *Braz J Med Biol Res*. 2008, 41(7), 545-556.
- [333] Baggio, S.R.; Bragagnolo, N.; The effect of heat treatment on the cholesterol oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid contents of processed meat products, *Food Chemistry*. 2006, 95(4), 611-619.
- [334] Lemaire-Ewing, S.; Prunet, C.; Montange, T.; Vejux, A.; Berthier, A.; Bessede, G.; Corcos, L.; Gambert, P.; Neel, D.; Lizard, G.; Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols, *Cell Biol Toxicol*. 2005, 21(2), 97-114.
- [335] Kowalska, D.; Gugolek, A.; Kobylarz, P.; Wpływ metody pakowania i przechowywania na właściwości fizykochemiczne mięsa królików żywionych mieszankami paszowymi wzbogaconymi olejem rybny i witaminą E, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2015, 1(98), 58-74.
- [336] Coetzee, G.; Hoffman, L.; Effect of dietary vitamin E on the performance of broilers and quality of broiler meat during refrigerated and frozen storage., *South African Journal of Animal Science*. 2001, 31(3), 158-174.
- [337] Belazi, D.; Sole-Domenech, s.; Johansson, B.; Schalling, M.; Sjoval, P.; Chemical analysis of osmium tetroxide staining in adipose tissue using imaging ToF-SIMS, *Histochem Cell Biol*. 2009, 132(1), 105-115.
- [338] Magnusson, Y.; Friberg, P.; Sjoval, P.; Dangardt, F.; Malmberg, P.; Chen, Y.; Lipid imaging of human skeletal muscle using TOF-SIMS with bismuth cluster ion as a primary ion source, *Clin Physiol Funct Imaging*. 2008, 28(3), 202-209.
- [339] Yang, H.J.; Ishizaki, I.; Sanada, N.; Zaima, N.; Sugiura, Y.; Yao, I.; Ikegami, K.; Detection of characteristic distributions of phospholipid head groups and fatty acids on neurite surface by time-of-flight secondary ion mass spectrometry, *Medical Molecular Morphology*. 2010, 43(3), 158-164.
- [340] Yang, H.-J.; Sugiura, Y.; Ishizaki, I.; Sanada, N.; Ikegami, K.; Zaima, N.; Shrivastava, K.; Setou, M.; Imaging of lipids in cultured mammalian neurons by matrix assisted laser/desorption ionization and secondary ion mass spectrometry, *Surface and Interface Analysis*. 2010, 42(10-11), 1606-1611.
- [341] Lanekoff, I.; Kurczy, M.E.; Hill, R.; Fletcher, J.S.; Vickerman, J.C.; Winograd, N.; Sjövall, P.; Ewing, A.G.; Time of Flight Mass Spectrometry Imaging of Samples Fractured In Situ with a Spring-Loaded Trap System, *Analytical Chemistry*. 2010, 82(15), 6652-6659.
- [342] Kurczy, M.E.; Piehowski, P.D.; Van Bell, C.T.; Heien, M.L.; Winograd, N.; Ewing, A.G.; Mass spectrometry imaging of mating *Tetrahymena* show that changes in cell morphology regulate lipid domain formation, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(7), 2751-2756.
- [343] Passarelli, M.K.; Winograd, N.; Characterizing in situ Glycerophospholipids with SIMS and MALDI Methodologies, *Surface and interface analysis : SIA*. 2011, 43(1-2), 269-271.
- [344] Altelaar, A.F.; Klinkert, I.; Jalink, K.; de Lange, R.P.; Adan, R.A.; Heeren, R.M.; Piersma, S.R.; Gold-enhanced biomolecular surface imaging of cells and tissue by SIMS and MALDI mass spectrometry, *Anal Chem*. 2006, 78(3), 734-742.

- [345] Roddy, T.P.; Cannon, D.M.; Meserole, C.A.; Winograd, N.; Ewing, A.G.; Imaging of Freeze-Fractured Cells with in Situ Fluorescence and Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 2002, 74(16), 4011-4019.
- [346] Malmberg, P.; Borner, K.; Chen, Y.; Friberg, P.; Hagenhoff, B.; Mansson, J.E.; Nygren, H.; Localization of lipids in the aortic wall with imaging TOF-SIMS, *BBA – Molecular and Cell biology of Lipids*. 2007, 1771(2), 185-195.
- [347] Borner, K.; Nygren, H.; Hagenhoff, B.; Malmberg, P.; Tallarek, E.; Mansson, J.E.; Distribution of cholesterol and galactosylceramide in rat cerebellar white matter, *Biochim Biophys Acta*. 2006, 1761(3), 335-344.
- [348] Piehowski, P.D.; Carado, A.J.; Kurczy, M.E.; Ostrowski, S.G.; Heien, M.L.; Winograd, N.; Ewing, A.G.; MS/MS methodology to improve subcellular mapping of cholesterol using TOF-SIMS, *Anal Chem*. 2008, 80(22), 8662-8667.
- [349] Gong, H.; Amemiya, T.; Takaya, K.; Tozu, M.; Ohashi, Y.; Time-of-flight secondary ion mass spectrometry of fatty acids in rat retina, *Applied Surface Science*. 2003. 203(Supplement C), 734-737.
- [350] Kezutyte, T.; Desbenoit, N.; Brunelle, A.; Briedis, V.; Studying the penetration of fatty acids into human skin by ex vivo TOF-SIMS imaging, *Biointerphases*. 2013, 8(1), 3.
- [351] Pernber, Z.; Richter, K.; Mansson, J.E.; Nygren, H.; Sulfatide with different fatty acids has unique distributions in cerebellum as imaged by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS), (*BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007, 1771(2), 202-209.

ANEKS

Masy charakterystyczne dla lipidów zidentyfikowane techniką TOF-SIMS w próbkach pochodzenia biologicznego. Klasyfikację wykonano wedle systemu zaproponowanego przez Lipid MAPS.

JONY DODATNIE

Kategoria	MASA [m/z]	WZÓR SUMARY- CZNY	NAZWA ZWIĄZKU	UKŁAD BIOLOGICZNY
KWASY TŁUSZCZOWE	27,02	C ₂ H ₃ ⁺	Fragment kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego, stearynowego	
	29,04	C ₂ H ₅ ⁺	Fragment kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego, stearynowego	
	41,04	C ₃ H ₅ ⁺	Fragment kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego	
	43,00	C ₃ H ₇ ⁺ lub C ₂ H ₂ O ⁺	Łańcuch węglowy lub fragment kwasu: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego	
	44,05	C ₂ H ₆ N ⁺	Fragment kwasów tłuszczowych	
	45,00	CHO ₂ ⁺	Fragment kwasów tłuszczowych	
	53,00	C ₄ H ₅ ⁺	Fragment łańcucha węglowego	
	55,06	C ₄ H ₇ ⁺	Łańcuch węglowy lub fragment kwasu: arachidowego, mirystynowego oraz palmitynowego	
	57,07	C ₄ H ₉ ⁺	Łańcuch węglowy lub fragment kwasu: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego	
	67,00	C ₅ H ₇ ⁺	Fragment łańcucha węglowego	
	69,07	C ₅ H ₉ ⁺	Łańcuch węglowy lub fragment kwasu: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego	
	88,04	C ₃ H ₆ NO ₂ ⁺	Fragment kwasu asparaginowego	
	102,06	C ₄ H ₈ NO ₂ ⁺	Fragment kwasu glutaminowego	
	109,10	C ₈ H ₁₃ ⁺	Fragment kwasu: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego	
	150,00	C ₅ H ₁₃ NPO ₂ ⁺	Fragment grupy głównej	
	183,00	C ₁₂ H ₂₃ O ⁺	Fragment kwasu dodekanowego	
	211,21	C ₁₄ H ₂₇ O ⁺	Fragment kwasu mirystynowego	
	229,21	C ₁₄ H ₂₉ O ₂ ⁺	Jon molekularny kwasu mirystynowego	
	239,26	C ₁₆ H ₃₁ O ⁺	Fragment kwasu palmitynowego	
	255,23	C ₁₆ H ₃₁ O ₂ ⁺	Fragment kwasu palmitynowego (16:0)	tkanka tłuszczowa [337], mięśnie [338], wątroba [212], mysi neuron [339], oocyt <i>Xenopus laevis</i> [187]
	257,00	C ₁₆ H ₃₃ O ₂ ⁺	Jon macierzysty kwasu palmitynowego	
	267,27	C ₁₈ H ₃₅ O ⁺	Fragment kwasu stearynowego	
	279,24	C ₁₈ H ₃₁ O ₂ ⁺	Jon molekularny kwasu linolowego (18:2)	oocyt <i>Xenopus</i>

GLICEROLIPIDY				<i>laevis</i> [187]
	281,25	C ₁₈ H ₃₃ O ₂ ⁺	Jon molekularny kwasu oleinowego (18:1)	mysi neuron [339], oocyt <i>Xenopus laevis</i> [187]
	283,26	C ₁₈ H ₃₅ O ₂ ⁺	Fragment kwasu stearynowego (18:0)	tkanka tłuszczowa [337], mięśnie [338], wątroba [212], myszy neuron [340]
	285,29	C ₁₈ H ₃₇ O ₂ ⁺	Jon macierzysty kwasu stearynowego	
	303,00	C ₂₀ H ₃₁ O ₂ ⁺	Fragment kwasu arachidonowego	
	313,32	C ₂₀ H ₄₁ O ₂ ⁺	Jon macierzysty kwasu arachidonowego	
	327,00	C ₂₂ H ₃₁ O ₂ ⁺	Fragment kwasu dokozaheksanowego	
	239,26	C ₁₆ H ₃₁ O ⁺	Fragment diglicerydu 32:0, 34:1	
	265,27	C ₁₈ H ₃₃ O ⁺	Fragment diglicerydu 34:1	
	311,30	C ₁₉ H ₃₅ O ₃ ⁺	Fragment monoacyloglicerolu (16:1), [M+H-OH] ⁺	wątroba [212]
	313,27	C ₁₉ H ₃₇ O ₃ ⁺	Fragment: monoacyloglicerolu (16:0) [M+H-OH] ⁺ , diglicerydu 32:0, triacyloglicerolu TAG (52:0)	wątroba [212]
	339,29	C ₂₁ H ₃₉ O ₃ ⁺	Fragment monoacyloglicerolu (18:1) [M+H-OH] ⁺ oraz diglicerydu 34:1	wątroba [212]
	341,30	C ₂₁ H ₄₁ O ₃ ⁺	Fragment monoacyloglicerolu (18:0), [M+H-OH] ⁺ oraz triacyloglicerolu TAG (52:0)	wątroba [212]
	519,00	C ₃₃ H ₅₉ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (30:2), [M+H-OH] ⁺	wątroba [212]
	521,00	C ₃₃ H ₆₁ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (30:1), [M+H-OH] ⁺	wątroba [212]
	523,47	C ₃₃ H ₆₃ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (30:0), [M+H-OH] ⁺	tkanka tłuszczowa [337], wątroba [212]
	547,00	C ₃₅ H ₆₃ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (32:2), [M+H-OH] ⁺	wątroba [212]
	549,00	C ₃₅ H ₆₅ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (32:1), [M+H-OH] ⁺	wątroba [212]
	551,50	C ₃₅ H ₆₇ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (32:0), [M+H-OH] ⁺	tkanka tłuszczowa [231, 337], mięśnie [338], wątroba [212]
	573,00	C ₃₇ H ₆₅ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (34:3), [M+H-OH] ⁺	wątroba [212]
	575,00	C ₃₇ H ₆₇ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (34:2), [M+H-OH] ⁺	wątroba [212]
	577,54	C ₃₇ H ₆₉ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (34:1), [M+H-OH] ⁺	tkanka tłuszczowa [231], mięśnie [338], wątroba [212]
	579,00	C ₃₇ H ₇₁ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (34:0), [M+H-OH] ⁺ oraz triacyloglicerolu TAG(52:0)	tkanka tłuszczowa [337]
	591,54	C ₃₅ H ₆₈ O ₅ Na ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (32:0)	
	599,00	C ₃₉ H ₆₇ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (36:4), [M+H-OH] ⁺	wątroba [212]
	601,00	C ₃₉ H ₆₉ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (36:3), [M+H-OH] ⁺	wątroba [212]
	603,54	C ₃₉ H ₇₁ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (36:2), [M+H-OH] ⁺	tkanka tłuszczowa [231], mięśnie

GLICEROFOSFOLIPIDY				[338], wątroba [212]
	605,40	C ₃₉ H ₇₃ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (36:1), [M+H-OH] ⁺	
	607,56	C ₃₉ H ₇₅ O ₄ ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (36:0), [M+H-OH] ⁺ oraz triacyloglicerolu TAG(52:0)	tkanka tłuszczowa [337]
	617,52	C ₃₇ H ₇₀ O ₅ Na ⁺	Fragment diacyloglicerolu DAG (34:1), [M+H-OH] ⁺	
	851,00	C ₅₃ H ₉₇ O ₆ Na ⁺	Fragment triacyloglicerolu TAG (50:3), [M+Na] ⁺	wątroba [212]
	853,00	C ₅₃ H ₉₈ O ₆ Na ⁺	Fragment triacyloglicerolu TAG (50:2), [M+Na] ⁺	wątroba [212]
	855,00	C ₅₃ H ₁₀₀ O ₆ Na ⁺	Fragment triacyloglicerolu TAG (50:1), [M+Na] ⁺	wątroba [212]
	857,00	C ₅₃ H ₁₀₂ O ₆ Na ⁺	Fragment triacyloglicerolu TAG (50:0), [M+Na] ⁺	wątroba [212]
	879,00	C ₅₅ H ₁₀₀ O ₆ Na ⁺	Fragment triacyloglicerolu TAG (52:3), [M+Na] ⁺	wątroba [212]
	881,00	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆ Na ⁺	Fragment triacyloglicerolu TAG (52:2), [M+Na] ⁺	wątroba [212]
	883,00	C ₅₅ H ₁₀₄ O ₆ Na ⁺	Fragment triacyloglicerolu TAG (52:1), [M+Na] ⁺	wątroba [212]
	885,00	C ₅₅ H ₁₀₆ O ₆ Na ⁺	Fragment triacyloglicerolu TAG (52:0), [M+Na] ⁺	wątroba [212]
	901,81	C ₅₅ H ₁₀₆ O ₆ K ⁺	Fragment triacyloglicerolu TAG (52:0), [M+Na] ⁺	
	104,11	C ₅ H ₁₄ NO ⁺	Fragment fosfatydylocholin: PC 28:0, PC 32:0, PC 34:1, PC 34:2	neurony myszy [339]
	124,02	C ₂ H ₇ NO ₃ P ⁺	Fragment fosfatydyloetanolamin: PE 28:0, PE 32:0, PE 34:1	
	125,01	C ₂ H ₆ O ₄ P ⁺	Fragment fosfatydylocholin: PC 28:0, PC 32:0, PC 34:1, PC 34:2	
	126,00	C ₂ H ₉ NPO ₃ ⁺	Fragment glicerofosfoetanolaminy	PC-12 [*] [341], <i>Tetrahymena thermophila</i> [203, 342]
	142,00	C ₂ H ₉ NPO ₄ ⁺	Fragment fosfatydyloetanolamin: PE 28:0, PE 34:1	PC-12 [341], <i>Tetrahymena thermophila</i> [203, 342]
	166,06	C ₅ H ₁₃ NPO ₃ ⁺	Fragment fosfatydylocholin: PC 28:0, PC 32:0, PC 34:1, PC 34:2	PC-12 [*] [341], oocyt [187]
	206,00	C ₅ H ₁₄ PO ₄ Na ⁺	Fragment fosfatydylocholiny	neurony myszy [339]
	224,10	C ₈ H ₁₉ NPO ₄ ⁺	Fragment fosfatydylocholin: PC 28:0, PC 32:0, PC 34:1, PC 34:2	PC-12 [*] [341], neurony myszy [339]
	246,10	C ₈ H ₁₈ NPO ₄ Na ⁺	Fragment glicerofosfocholiny	neurony myszy [339]
	254,26	C ₁₆ H ₃₀ O ₂ ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 28:0	
	287,04	C ₈ H ₁₆ PO ₉ ⁺	Fragment fosfatydyloinozytolu PI 34:2	
	450,36	C ₂₂ H ₄₅ NO ₆ P ⁺	Fragment fosfatydylocholiny PC 28:0	
	464,36	C ₂₂ H ₄₃ NO ₇ P ⁺	Fragment fosfatydylocholiny PC 28:0	
	478,39	C ₂₄ H ₄₉ NO ₆ P ⁺	Fragment fosfatydylocholiny PC 32:0	
	495,45	C ₃₀ H ₅₅ O ₅ ⁺	Fragment fosfatydylocholiny PC 28:0	
	636,55	C ₃₃ H ₆₇ NO ₈ P ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 28:0	
	658,47	C ₃₃ H ₆₆ NO ₈ PO ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 28:0	
	674,43	C ₃₃ H ₆₆ NO ₈ PK ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 28:0	
	678,49	C ₃₆ H ₇₃ NO ₈ P ⁺	Fragment fosfatydylocholiny PC 28:0	
	692,63	C ₃₇ H ₇₅ NO ₈ P ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 32:0	
	700,58	C ₃₆ H ₇₂ NO ₈ PNa ⁺	Fragment fosfatydylocholiny PC 28:0	

709,00	C ₃₉ H ₇₅ O ₇ PNa ⁺	Fragment glicerofosfocholiny (16:0e/18:1), [M+Na-TMA] ⁺	neurony <i>Aplysia californica</i> [343]
714,58	C ₃₇ H ₇₄ NO ₈ PNa ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 32:0	
716,61	C ₃₉ H ₇₅ NO ₈ P ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 34:2	
717,45	C ₃₇ H ₆₈ PO ₈ Na ₂ ⁺	Fragment fosfatydyloinozytolu PI 34:2	
725,00	C ₃₉ H ₇₅ O ₇ PK ⁺	Fragment glicerofosfocholiny (16:0e/18:1) [M+Na-TMA] ⁺	neurony <i>Aplysia californica</i> [343]
730,54	C ₃₇ H ₇₄ NO ₈ PK ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 32:0	
732,55	C ₄₀ H ₇₉ NO ₈ P ⁺	Fragment glicerofosfocholiny GPCho(32:1), [M+H] ⁺	komórki neuroblastomy [344]
734,57	C ₄₀ H ₈₁ NO ₈ P ⁺	Jon molekularny fosfatydylocholiny PC 32:0, [M+H] ⁺	mózg [204, 270], mięśnie [211]
740,58	C ₃₉ H ₇₆ NO ₈ PNa ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 34:1	
746,00	C ₄₂ H ₈₅ NO ₇ P ⁺	Jon molekularny glicerofosfocholiny (16:0e/18:1), [M+H] ⁺	neurony <i>Aplysia californica</i> [343], komórki neuroblastomy [344]
746,57	C ₄₁ H ₈₁ NO ₈ P ⁺	Jon macierzysty glicerofosfoetanolaminy GPETHn(36:1), [M+H] ⁺	komórki neuroblastomy [344]
756,55	C ₃₉ H ₇₆ NO ₈ PK ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 34:1	
758,57	C ₄₂ H ₈₁ NO ₈ P ⁺	Jon macierzysty glicerofosfocholiny PC 34:2, [M+H] ⁺	wątroba [212], komórki neuroblastomy [344]
760,59	C ₄₂ H ₈₃ NO ₈ P ⁺	Jon macierzysty fosfatydylocholiny PC 34:1, [M+H] ⁺	mięśnie [211], mózg [270] [204], wątroba [212], komórki neuroblastomy [344]
768,00	C ₄₂ H ₈₄ NO ₇ PNa ⁺	Jon macierzysty z adduktem glicerofosfocholiny GPCho(16:0e/18:1) [M+Na] ⁺	neurony <i>Aplysia californica</i> [343]
770,65	C ₄₁ H ₈₂ NO ₈ ONa ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 36:0	
782,00	C ₄₂ H ₈₃ NO ₈ PNa ⁺	Jon macierzysty glicerofosfocholiny PC 34:1 [M+Na] ⁺	komórki neuroblastomy [344], neurony myszy [340]
784,00	C ₄₂ H ₈₄ NO ₇ PK ⁺	Jon macierzysty z adduktem glicerofosfocholiny GPCho(16:0e/18:1), [M+K] ⁺	neurony <i>Aplysia californica</i> [343]
786,60	C ₄₁ H ₈₂ NO ₈ PK ⁺	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 36:0	

	788,62	C ₄₄ H ₈₇ NO ₈ P ⁺	Jon macierzysty glicerofosfocholiny GPCho(36:1), [M+H] ⁺	mózg [204, 270], komórki neuroblastomy [344]
	808,00	C ₄₆ H ₈₃ NO ₈ P ⁺	Jon macierzysty glicerofosfocholiny GPCho(38:5), [M+H] ⁺	komórki neuroblastomy [344]
	810,00	C ₄₆ H ₈₅ NO ₈ P ⁺	Jon macierzysty glicerofosfocholiny GPCho(38:4), [M+H] ⁺	komórki neuroblastomy [344]
	879,51	C ₄₃ H ₇₈ PO ₁₃ Na ₂ ⁺	Fragment fosfatydyloinozytolu PI34:2	
SFINGOLIPIDY	86,10	C ₅ H ₁₂ N ⁺	Fragment sfingocholiny	neurony myszy [339]
	102,10	C ₅ H ₁₂ NO ⁺	Fragment ceramidu	neurony myszy [339]
	104,11	C ₅ H ₁₄ NO ⁺	Fragment ceramidu	neurony myszy [339]
	126,00	C ₂ H ₉ NPO ⁺	Fragment fosfosfingolipidu	PC-12* [345], <i>Tetrahymena thermophila</i> [203, 342]
	142,00	C ₂ H ₉ NPO ₄ ⁺	Fragment fosfosfingolipidu	PC-12* [345], <i>Tetrahymena thermophila</i> [203, 342]
	184,07	C ₅ H ₁₅ PNO ₄ ⁺	Fragment ceramidu	neurony myszy [339]
	264,31	C ₁₈ H ₃₂ O ⁺	Fragment ceramidu 36:1 (18:0/18:1)	
	282,31	C ₁₈ H ₃₄ O ₂ ⁺	Fragment ceramidu 36:1 (18:0/18:1)	
	670,63	C ₄₂ H ₈₁ NO ₃ Na ⁺	Fragment sulfatydu 42:2	
	750,59	C ₄₂ H ₈₁ NO ₈ Na ⁺	Jon macierzysty glikosfingolipidu z adduktem C 18:0, [M+Na] ⁺	mózg [222], aorta [346]
	822,60	C ₄₆ H ₈₉ NO ₉ Na ⁺	Jon macierzysty glikosfingolipidu z adduktem C 22:0, [M+Na] ⁺	mózg [222, 347]
	832,60	C ₄₈ H ₉₁ NO ₈ Na ⁺	Jon macierzysty glikosfingolipidu z adduktem C 18:0, [M+Na] ⁺ oraz fragment sulfatydu 42:2	mózg [222, 347]
	834,60	C ₄₈ H ₉₃ NO ₈ Na ⁺	Jon macierzysty glikosfingolipidu z adduktem C 24:0c, [M+Na] ⁺	mózg [222, 347], aorta [346]
	836,60	C ₄₇ H ₉₁ NO ₉ Na ⁺	Jon macierzysty glikosfingolipidu z adduktem C 23:0, [M+Na] ⁺	mózg [222]
	848,60	C ₄₈ H ₉₁ NO ₉ Na ⁺	Jon macierzysty glikosfingolipidu z adduktem C 24:1, [M+Na] ⁺	mózg [222, 347]
	934,66	C ₄₈ H ₉₀ SNO ₁₁ Na ₂ ⁺	Jon macierzysty dla sulfatydu 42:2	
STEROLE	95,00	C ₇ H ₁₁ ⁺	Fragment cholesterolu i jego pochodnych	J774**[348]
	147,00	C ₁₁ H ₁₅ ⁺	Fragment cholesterolu i jego pochodnych	J774**[348]
	161,00	C ₁₂ H ₁₇ ⁺	Fragment cholesterolu i jego pochodnych	J774**[348]
	369,35	C ₂₇ H ₄₅ ⁺	Fragment cholesterolu [M+H-H ₂ O] ⁺	mózg [270, 347], wątroba [212], tkanka tłuszczowa [231], J774*[348], PC-12*[345]
	385,35	C ₂₇ H ₄₆ O ⁺	Jon macierzysty cholesterolu [M-H] ⁺	mózg [270, 347], wątroba

				[212], PC-12*[345]
	399,30	C ₂₇ H ₄₃ O ₂ ⁺	Fragment 7-ketocholesterolu	aorta [346]
	429,38	C ₂₉ H ₄₉ O ₂ ⁺	Jon macierzysty dla 7-ketocholesterolu, [M+H] ⁺	
	583,00	C ₂₇ H ₄₆ OAu ⁺	Jon macierzysty cholesterolu z adduktem [M+Au] ⁺	komórki neuroblastomy [344]
	753,74	(C ₂₇ H ₄₄) ₂ OH ⁺	Podwojona cząsteczka cholesterolu [2M-H3O] ⁺	
	970,00	C ₅₄ H ₉₃ O ₂ Au ⁺	Podwojona cząsteczka cholesterolu z adduktem [2M+Au] ⁺	komórki neuroblastomy [344]
	1167,00	C ₅₄ H ₉₃ Au ₂ ⁺	Podwojona cząsteczka cholesterolu z adduktem [2M+Au] ⁺	komórki neuroblastomy [344]
PRENOLE	165,00	C ₁₀ H ₁₃ O ₂ ⁺	Fragment α-tokoferolu	neurony <i>Aplysia californica</i> [228]
	203,11	C ₁₃ H ₁₅ O ₂ ⁺	Fragment α-tokoferolu	
	205,00	C ₁₃ H ₁₇ O ₂ ⁺	Fragment α-tokoferolu	neurony <i>Aplysia californica</i> [228]
	430,38	C ₂₉ H ₅₀ O ₂ ⁺	Jon macierzysty dla witaminy E [M+H] ⁺	siatkówka [349], wątroba [212], neurony <i>Aplysia californica</i> [228]
	858,74	C ₅₈ H ₉₈ O ₄ ⁺	Fragment α-tokoferolu	

*- PC12 jest to nowotworowa linia komórkowa, pochodząca z guza chromochłonnego nadnercza szczura

** - J774 linia komórkowa mysich makrofagów

JONY UJEMNE

Kategoria	MASA [m/z]	WZÓR SUMARYCZNY	NAZWA ZWIĄZKU	UKŁAD BIOLOGICZNY
KWASY TŁUSZCZOWE	38,01	C ₃ H ₂ ⁻	Fragment kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego, stearynowego	
	39,99	C ₂ O ⁻	Fragment dla kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego oraz stearynowego	
	41,00	C ₂ HO ⁻	Fragment dla kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego oraz stearynowego	
	43,01	C ₂ H ₃ O ⁻	Fragment dla kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego oraz stearynowego	

58,00	$C_2H_2O_2^-$	Fragment dla kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego oraz stearynowego	
59,01	$C_2H_3O_2^-$	Fragment kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego, stearynowego	
113,06	$C_6H_9O_2^-$	Fragment kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego, stearynowego	
127,08	$C_7H_{11}O_2^-$	Fragment kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego, stearynowego	
141,09	$C_8H_{13}O_2^-$	Fragment kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego, stearynowego	
155,11	$C_9H_{15}O_2^-$	Fragment kwasów: arachidowego, mirystynowego, palmitynowego, stearynowego	
169,12	$C_{10}H_{17}O_2^-$	Fragment kwasów: arachidowego, palmitynowego	
171,09	$C_{10}H_{20}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu kaprynowego (dekanowego) $[M-H]^-$	
183,13	$C_{11}H_{19}O_2^-$	Fragment kwasów: arachidowego, palmitynowego	
197,16	$C_{12}H_{21}O_2^-$	Fragment kwasów: arachidowego, palmitynowego	
198,96	$C_{12}H_{24}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu laurynowego $[M-H]^-$	
211,18	$C_{13}H_{23}O_2^-$	Fragment kwasów: arachidowego, palmitynowego	
225,20	$C_{14}H_{25}O_2^-$	Fragment dla kwasów: mirystynowego, palmitynowego	
227,20	$C_{14}H_{27}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu mirystynowego $[M-H]^-$	wątroba [221]
237,23	$C_{16}H_{29}O^-$	Fragment kwasu palmitynowego	skóra [360]
251,20	$C_{16}H_{27}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu heksadekodenowego FA(16:2), $[M-H]^-$	mięśnie [220]
253,20	$C_{16}H_{29}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu cis-9-heksadecenowego (16:1), $[M-H]^-$	wątroba [221], tkanka tłuszczowa [240], mięśnie [220, 348]
255,23	$C_{16}H_{31}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu palmitynowego FA(16:0), $[M-H]^-$	wątroba [221], tkanka tłuszczowa [240, 347], mięśnie [348]
256,24	$C_{16}H_{32}O_2^-$	Fragment kwasu palmitynowego	
277,20	$C_{18}H_{29}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu linolenowego FA(18:3), $[M-H]^-$	mięśnie [220]
279,23	$C_{18}H_{31}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu linolowego FA(18:2), $[M-H]^-$	wątroba [221], tkanka tłuszczowa [240], mięśnie [220]
281,20	$C_{18}H_{33}O_2^-$	Jon macierzysty dla kwasu oleinowego (18:1), $[M-H]^-$	wątroba [221], tkanka tłuszczowa [240], mięśnie [220]
283,26	$C_{18}H_{35}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu stearynowego FA(18:0), $[M-H]^-$	wątroba [221], tkanka tłuszczowa

				[347], mięśnie [220, 348]
	303,24	$C_{20}H_{31}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu arachidonowego FA(20:4), [M-H] ⁻	mięśnie [220]
	305,25	$C_{20}H_{33}O_2^-$	Jon macierzysty kwasu dihomo- γ -linolenowego [M-H] ⁻	
	309,29	$C_{20}H_{37}O_2^-$	Fragment kwasu arachidonowego	
	311,30	$C_{20}H_{39}O_2^-$	Fragment kwasu arachidonowego	
	312,31	$C_{20}H_{40}O_2^-$	Fragment kwasu arachidonowego	
GLICEROLIPIDY	281,20	$C_{18}H_{33}O_2^-$	Fragment diglicerydu 34:1	tkanka tłuszczowa [347], mięśnie [220]
	567,54	$C_{35}H_{67}O_5^-$	Fragment diglicerydu 32:0	
	593,55	$C_{37}H_{69}O_5^-$	Fragment diglicerydu 34:1	
	805,00	$C_{51}H_{97}O_6^-$	Fragment triacyloglicerolu TAG (48:0), [M-H] ⁻	tkanka tłuszczowa [347]
	829,00	$C_{53}H_{97}O_6^-$	Fragment triacyloglicerolu TAG (50:2), [M-H] ⁻	mięśnie [220]
	833,00	$C_{53}H_{101}O_6^-$	Fragment triacyloglicerolu TAG (50:0), [M-H] ⁻	tkanka tłuszczowa [347]
	855,71	$C_{55}H_{99}O_6^-$	Fragment triacyloglicerolu TAG (52:3), [M-H] ⁻	mózg, tkanka tłuszczowa [347]
	857,63	$C_{55}H_{101}O_6^-$	Fragment triacyloglicerolu TAG (52:2), [M-H] ⁻	tkanka tłuszczowa [240], mięśnie [220]
	861,87	$C_{55}H_{105}O_6^-$	Fragment triacyloglicerolu TAG (52:0), [M-H] ⁻	tkanka tłuszczowa [347]
	881,00	$C_{57}H_{101}O_6^-$	Fragment triacyloglicerolu TAG (54:4), [M-H] ⁻	mięśnie [348]
GLICEROFOSFOLIPIDY	883,00	$C_{57}H_{99}O_6^-$	Fragment triacyloglicerolu TAG (54:3), [M-H] ⁻	tkanka tłuszczowa [240]
	59,00	$C_3H_9N^-$	Fragment glicerofosfocholiny	neurony mysie [349], oocyty [196]
	62,96	PO_2^-	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 28:0, PE 32:0	neurony [349]
	71,00	$C_3H_3O_2^-$	Fragment fosfatydylocholiny	neurony [349]
	78,96	PO_3^-	Fragment fosfatydylocholiny PC 28:0, PC 32:0, PC 34:1, PC 34:2 oraz fosfatydyloetanolaminy PE 28:0	
	79,00	PO_3^-	Fragment fosfatydylocholiny	

SFINGOLIPIDY	96,96	SO ₄ H ⁻	Fragment fosfatydylocholin: PC 28:0, PC 32:0, PC 34:1, PC 34:2	
	97,00	PO ₄ H ₂ ⁻	Fragment fosfatydylocholin	neurony [349]
	109,98	CH ₃ O ₄ P ⁻	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 28:0	
	122,01	C ₂ H ₅ NO ₃ P ⁻	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 32:0	
	122,99	C ₂ H ₄ OP ⁻	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 28:0	
	123,00	C ₂ H ₄ PO ₄ ⁻	Fragment fosfatydylocholin	
	140,02	C ₂ H ₇ NO ₄ P ⁻	Fragment fosfatydyloetanolamin: PE 28:0, PE 32:0, PE 34:1	
	153,02	C ₃ H ₈ NO ₄ P ⁻	Fragment fosfatydyloetanolamin: PE 28:0, PE 32:0	
	159,00	P ₂ O ₈ H ⁻	Fragment fosfatydylocholin	
	180,04	C ₅ H ₁₁ NO ₄ P ⁻	Fragment fosfatydyloetanolamin: PE 28:0, PE 32:0	
	223,01		Fragment fosfatydyloinozytolu	
	227,20	C ₁₄ H ₂₇ O ₂ ⁻	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 28:0	wątroba [221]
	241,06	C ₆ H ₁₀ PO ₈ ⁻	Fragment fosfatydyloinozytolu PI 34:2	
	255,23	C ₁₆ H ₃₁ O ₂ ⁻	Fragment fosfatydyloinozytolu PI 34:2 oraz fosfatydylocholin PC 34:2	wątroba [221], tkanka tłuszczowa [347]
	279,23	C ₁₈ H ₃₁ O ₂ ⁻	Fragment fosfatydyloinozytolu oraz fosfatydylocholin PC 34:2	wątroba [221], tkanka tłuszczowa [347]
	299,10	C ₉ H ₁₆ PO ₉ ⁻	Fragment fosfatydyloinozytolu PI 34:2	
	634,46	C ₃₃ H ₆₅ NO ₈ P ⁻	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 28:0	
	690,56	C ₃₇ H ₇₃ NO ₈ P ⁻	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 32:0	
	699,60	C ₃₉ H ₇₂ O ₈ P ⁻	Fragment fosfatydylocholin PC 34:1	mózg [213]
	714,55	C ₃₉ H ₇₃ NO ₈ P ⁻	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 34:1	
	716,54	C ₃₉ H ₇₅ NO ₈ P ⁻	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 34:1	
	746,60	C ₄₁ H ₈₁ NO ₈ P ⁻	Fragment fosfatydyloetanolaminy PE 36:0	
	833,71	C ₄₃ H ₇₈ PO ₁₃ ⁻	Fragment fosfatydyloinozytolu PI 34:2	
	857,50	C ₄₅ H ₇₈ O ₁₃ P ⁻	Jon macierzysty dla fosfatydyloinozytolu PI 36:4, [M-H] ⁻	mózg [213, 279]
	885,58	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P ⁻	Jon macierzysty dla fosfatydyloinozytolu PI 38:4, [M-H] ⁻	mózg [213, 279], wątroba [221], tkanka tłuszczowa [347]
	887,60	C ₄₇ H ₈₄ O ₁₃ P ⁻	Jon macierzysty dla fosfatydyloinozytolu PI 38:3, [M-H] ⁻	wątroba [221]
	79,96	SO ₃ ⁻	Fragment sulfatydu 42:2	
	96,96	SO ₄ H ⁻	Fragment sulfatydu 42:2	
	237,23	C ₁₆ H ₂₉ O ⁻	Fragment ceramidu 36:1	skóra [360]
	265,27	C ₁₈ H ₃₃ O ⁻	Fragment ceramidu 36:1	
	283,26	C ₁₈ H ₃₅ O ₂ ⁻	Fragment ceramidu 36:1	
	324,29	C ₂₀ H ₃₈ NO ₂ ⁻	Fragment ceramidu 36:1	skóra [360]

404,31	C ₂₀ H ₃₉ NO ₅ P ⁻	Fragment fosfosfingolipidu SM 34:1	
447,34	C ₂₂ H ₄₄ N ₂ O ₅ P ⁻	Fragment fosfosfingolipidu SM 34:1	
540,32	C ₂₄ H ₄₆ SNO ₁₀ ⁻	Fragment sulfatydu 42:2	
564,54	C ₃₆ H ₇₀ NO ₃ ⁻	Fragment ceramidu 36:1	
598,52	C ₃₄ H ₆₅ NO ₅ P ⁻	Fragment fosfosfingolipidu SM 34:1	
616,50	C ₃₄ H ₆₇ NO ₆ P ⁻	Fragment fosfosfingolipidu SM 34:1	wątroba [221]
642,60	C ₃₆ H ₆₉ NO ₆ P ⁻	Fragment fosfosfingolipidu SM 34:1	wątroba [221]
687,60	C ₃₈ H ₇₆ N ₂ O ₆ P ⁻	Fragment fosfosfingolipidu SM 34:1, [M-CH ₃] ⁻	wątroba [221]
701,68	C ₃₉ H ₇₈ N ₂ O ₆ P ⁻	Fragment fosfosfingolipidu SM 34:1	
778,50	C ₄₀ H ₇₆ SNO ₁₁ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 16:0a [M-H] ⁻	mózg [361]
794,60	C ₄₀ H ₇₆ SNO ₁₂ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 16, [M-H] ⁻	mózg [361]
806,55	C ₄₂ H ₈₀ SNO ₁₁ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 18:0, [M-H] ⁻	mózg [213, 279, 361]
806,59	C ₂₅ H ₄₅ O ₁₁ NS ⁻	Fragment sulfatydu 18:0	
822,50	C ₄₂ H ₈₀ SNO ₁₂ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 18:0, [M-H] ⁻	mózg [213, 279, 361]
834,60	C ₄₄ H ₈₄ SNO ₁₁ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 20:0, [M-H] ⁻	mózg [213, 279, 361]
850,60	C ₄₄ H ₈₄ SNO ₁₂ ⁻	Fragment glikosfingolipidu C 22	mózg [213, 279, 361]
862,61	C ₄₆ H ₈₈ SNO ₁₁ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 22:0, [M-H] ⁻	mózg [213, 279, 361]
876,70	C ₄₇ H ₉₀ SNO ₁₁ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 23:0, [M-H] ⁻	mózg [279, 361]
878,60	C ₄₆ H ₈₈ SNO ₁₂ ⁻	Fragment glikosfingolipidu C 22	mózg [213, 279, 361]
888,62	C ₄₈ H ₉₀ SNO ₁₁ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 24:1, [M-H] ⁻	mózg [213, 279, 361]
890,64	C ₄₈ H ₉₂ SNO ₁₁ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 24:0, [M-H] ⁻	mózg [213, 279, 361]
902,60	C ₄₉ H ₉₂ SNO ₁₁ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 25:1, [M-H] ⁻	mózg [279, 361]
904,62	C ₄₈ H ₉₀ SNO ₁₂ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 24:1 lub C 25:0	mózg [213, 279, 361]
906,63	C ₄₈ H ₉₂ SNO ₁₂ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C24-OH, [M-H] ⁻	mózg [213, 279, 361]
916,60	C ₅₀ H ₉₄ SNO ₁₁ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 26:1, [M-H] ⁻	mózg [361]
918,60	C ₄₉ H ₉₂ SNO ₁₂ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 25:1 lub C26, [M-H] ⁻	mózg [361]
932,70	C ₅₀ H ₉₄ SNO ₁₂ ⁻	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 26:1, [M-H] ⁻	mózg [361]

	934,60	$C_{50}H_{96}SNO_{12}^-$	Jon macierzysty glikosfingolipidu C 26, [M-H] ⁻	mózg [361]
STEROLE	79,96	SO_3^-	Fragment cholesterolu i jego pochodnych	
	96,96	SO_4H^-	Fragment cholesterolu i jego pochodnych	
	385,40	$C_{27}H_{45}O^-$	Jon macierzysty cholesterolu [M-H] ⁻	mięśnie [220], mózg [279]
	465,31	$C_{27}H_{45}SO_4^-$	Jon macierzysty siarczanu cholesterolu	
	771,74	$C_{54}H_{91}O_2^-$	Podwojona cząsteczka cholesterolu [2M-H] ⁻	
PRENOLE	163,08	$C_{10}H_{11}O_2^-$	Fragment α-tokoferolu	
	429,30	$C_{29}H_{49}O_2^-$	Jon macierzysty α-tokoferolu [M-H] ⁻	mięśnie [220], wątroba [221]
	795,60	$C_{54}H_{83}O_4^-$	Jon macierzysty koenzymu Q9 [M-H] ⁻	mięśnie [220]
	857,78	$C_{58}H_{97}O_4^-$	Fragment koenzymu Q9	