



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Weronika Hewelt-Belka
Dyscyplina naukowa: Chemia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Lipidomika gronkowca złocistego z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Lipidomics of *Staphylococcus aureus* with the use of high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

Promotor

podpis

Prof. dr hab. inż. Agata Kot-Wasik

Gdańsk, rok 2016

*Serdecznie dziękuję Pani **prof. dr hab. inż. Agacie Kot-Wasik** za merytoryczne wsparcie w trakcie tworzenia niniejszej pracy doktorskiej, za możliwość realizacji naukowych pomysłów oraz wszelką pomoc.*

*Dziękuję również **dr Joannie Nakoniecznej** za pomoc w realizacji badań, wsparcie merytoryczne oraz miłą atmosferę pracy*

*Panu **prof. dr hab. inż. Jackowi Namieśnikowi** dziękuję za wiele cennych, naukowych uwag, wsparcie oraz motywację do pracy.*

Pracownikom i Doktorantom Katedry Chemii Analitycznej za miłą i serdeczną atmosferę pracy, a w szczególności: panu dr hab. inż. Andrzejowi Wasikowi, dr inż. Annie Jakimskiej-Nagórskiej, dr inż. Pawłowi Kubicy, mgr inż. Dorocie Garwolińskiej, mgr inż. Katarzynie Nalazek i mgr inż. Justynie Aszyk.

Szczególne podziękowania chciałabym złożyć mężowi Mariuszowi, który jest dla mnie nie tylko nieocenionym wsparciem, ale też inspiracją do moich naukowych działań.

Dziękuję również mojej mamie, za wszelką pomoc i wsparcie.

Niniejszą pracę dedykuję córce Liliannie.

Praca została sfinansowana ze środków NCN w ramach grantu PRELUDIUM nr 2014/13/N/ST4/0389: „Porównanie lipidowych odcisków palca szczepów gronkowca złocistego z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-Q-TOF-MS) i zaawansowanych technik chemometrycznych

Spis treści

1	Wykaz skrótów i akronimów	8
2	Wprowadzenie.....	12
3	Część literaturowa	15
3.1	Lipidy.....	15
3.1.1	Struktura i funkcje lipidów gronkowca złocistego	18
3.2	Techniki analityczne stosowane w badaniach lipidomicznych	20
3.2.1	Techniki przygotowania próbki w lipidomice.....	22
3.2.2	Strategie analityczne w lipidomice w oparciu na spektrometrii mas	23
3.2.3	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w lipidomice	24
3.2.4	Oznaczenia lipidów w materiale biologicznym z wykorzystaniem techniki bezpośredniego wprowadzenia ekstraktu lipidów do komory jonizacyjnej spektrometru mas	27
3.2.5	Inne wybrane techniki wykorzystywane w analityce lipidów w próbkach materiału biologicznego.....	28
3.2.6	Techniki analityczne wykorzystywane do oznaczania lipidów gronkowca złocistego	30
3.3	Lipidomika niecelowana	31
3.3.1	Przygotowanie danych uzyskanych w wyniku analizy niecelowanej z wykorzystaniem techniki LC-MS do analizy statystycznej i chemometrycznej	32
3.3.2	Walidacja analityczna metod analizy niecelowanej.....	33
3.3.3	Analiza statystyczna i chemometryczna oraz względna analiza ilościowa w lipidomice niecelowanej	34
4	Cel i zakres pracy.....	37
5	Część doświadczalna	39
5.1	Opracowanie metodologii oznaczania lipidów komórkowych gronkowca złocistego	39

5.2	Określenie różnic lipidomicznych pomiędzy szczepami <i>S. aureus</i> o znanej różnicy genotypowej poprzez porównanie lipidowych odcisków palca uzyskanych z wykorzystaniem techniki LC-Q-TOF-MS.....	42
5.3	Porównanie lipidowych odcisków palca szczepów <i>S. aureus</i> o zróżnicowanej wrażliwości na antybiotyki z wykorzystaniem techniki LC-Q-TOF-MS.....	44
6	Wnioski końcowe.....	47
7	Literatura.....	49
8	Dorobek naukowy.....	62
	ZAŁĄCZNIK 1.....	65
	ZAŁĄCZNIK 2.....	91
	ZAŁĄCZNIK 3.....	108

1 Wykaz skrótów i akronimów

Skrót/Akronim	Termin angielski	Termin polski
ANOVA	Analysis of Variance	Analiza wariancji
BCFA	Branched-Chain Fatty Acid	Rozgałęziony kwas tłuszczowy
BUME	Buthanol-methanol	Mieszanka butanolu i metanolu
CDC	Center for Disease Control and Prevention	Centrum Zwalczania i zapobiegania chorobom
CE-UV	Capillary Electrophoresis with UV-Vis detection	Elektroforeza kapilarna z detekcją UV-Vis
CE-MS	Capillary Electrophoresis coupled with Mass Spectrometry	Elektroforeza kapilarna sprzężona ze spektrometrią mas
Cer	Ceramides	Ceramidy
CL	Cardiolipin	Kardiolipiny
CZE-LIF	Capillary Zone Electrophoresis - Laser Induced Fluorescence Detection	Elektroforeza kapilarna sprzężona z detekcją fluorescencyjną indukowaną laserem
DESI	Desorption Electrospray Ionisation	Jonizacja przez desorpcję wspomaganą elektrorozpyleniem
DG	Diacylglycerol	Diacyloglicerole
DGDG	Diglycosyldiacylglycerol	Diglikozylodiacyloglicerol
DLLME	Dispersive liquid-liquid extraction	Dyspersyjna mikroekstrakcja cieczy
ECC	Extracted Compound Chromatogram	Chromatogram wyodrębnionego indywiduum chemicznego
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector	Detektor światła rozproszonego
ESI	Electrospray Ionization	Jonizacja poprzez elektrorozpylenie
FA	Fatty Acid	Kwasy tłuszczowe
FT-ICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance	Analizator cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników
FTMS	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance	Analizator cyklotronowego rezonansu jonów z transformacją Fouriera
GalC	Galactocerebroside	Galaktocerebrozydy
GC	Gas Chromatography	Chromatografia gazowa
GC-FID	Gas Chromatography with Flame-Ionisation Detection	Chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym
GC-MS	Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
GC-MS/MS	Gas Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry	Chromatografia gazowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
GL	Glycerolipid	Glicerolipidy
Glc-DG	Glucosyldiacylglycerol	Glukozyldiacyloglicerole
Glc-Glc-DG	Diglucoyldiacylglycerol	Diglukozylodiacyloglicerole
GP	Glycerophospholipid	Glicerofosfolipidy
HPLC-MS/MS	High Performance Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry	Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
HPLC-Q-TOF-MS	High Performance Liquid Chromatography Quadrupole	Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze

	Time-of-Flight Mass Spectrometry	spektrometrię mas z analizatorami kwadropolowym i czasu przelotu
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography	Wysokosprawna cienkowarstwowa chromatografia cieczowa
LC	Liquid Chromatography	Chromatografia cieczowa
LC-MS	Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry	Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
LC-MS/MS	Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry	Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
LC-Q-TOF-MS	Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry	Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas z analizatorami mas kwadropolowym i czasu przelotu
LiOH	Lithium Hydroxide	Wodorotlenek litu
LLE	Liquid-Liquid Extraction	Ekstrakcja ciecz-ciecz
LTA	Lipoteichoic Acid	Kwas lipoteichoiczny
LTV	Linear Trap Quadrupole	Liniowa pułapka jonowa
Lys-PG	Lysyl-phosphatidylglycerol	Lizylofosfatydyloglicerol
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization	Jonizacja przez desorpcję laserową wspomaganą przez matrycę
MF	Molecular Feature	Indywidualne chemiczne
MFE	Molecular Feature Extraction	Ekstrakcja indywidualne chemiczne
MGDG	Monoglucosyldiacylglycerol	Monoglikozylodiacyloglicerole
MRM	Multiple Reaction Monitoring	Monitorowanie wielu reakcji fragmentacji jonów
MRSA	Methicillin Resistance <i>Staphylococcus aureus</i>	Gronkowiec złocisty odporny na metycylinę
MS	Mass Spectrometry	Spektrometria mas
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry	Tandemowa spektrometria mas
MSSA	Methicillin Resistance <i>Staphylococcus aureus</i>	Gronkowiec złocisty wrażliwy na metycylinę
MTBE	Methyl tert-butyl ether	Eter tert-butyloowo-metylowy
NACE	Nonaqueous Capillary Electrophoresis	Elektroforeza kapilarna z zastosowaniem niewodnych roztworów buforowych
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
OPLS-DA	Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis	Analiza dyskryminacyjna ortogonalnych częściowych najmniejszych kwadratów
Q-IT	Quadrupole Ion Trap	Kwadropolowa pułapka jonowa
Q-TOF	Quadrupole Time-of-Flight	Kwadropolowy analizator czasu przelotu
PA	Phosphatidic Acid	Kwas fosfatydowy
PC	Phosphocholine	Fosfocholina
PCA	Principal Component Analysis	Analiza głównych składowych
PE	Phosphoethanolamine	Fosfoetanolaminy
PG	Phosphatidylglycerol	Fosfatydyloglicerole
PK	Poliketide	Poliketidy
PLS-DA	Partial Least Square Discriminant Analysis	Analiza dyskryminacyjna częściowych najmniejszych kwadratów
PR	Prenols	Prenole

QQQ	Triple quadrupole	Potrójny kwadropol
SCAN	Scanning	Przemiatanie całego widma mas
SCFA	Straight-Chain Fatty Acid	Nierozgałęziony kwas tłuszczowy
SM	Sphingomyeline	Sfingomieline
SL	Saccharolipid	Sacharolipidy
SP	Sphingolipid	Sfingolipidy
SPE	Solid-Phase Extraction	Ekstrakcja do fazy stałej
SPME	Solid-Phase Microextraction	Mikroekstrakcja do fazy stałej
SRM	Single Reaction Monitoring	Monitorowanie wybranej reakcji fragmentacji jonów
ST	Sterol	Sterole
TCC	Total Compound Chromatogram	Chromatogram całkowitego prądu jonowego wszystkich wyodrębnionych indywidualów chemicznych
TIC	Total Ion Chromatogram	Chromatogram całkowitego prądu jonowego
TG	Triacylglycerol	Triacyloglicerole
TLC	Thin Layer Chromatography	Chromatografia cienkowarstwowa
UAE	Ultrasound Assisted Extraction	Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami
UHPLC	Ultrahigh Performance Liquid Chromatography	Ultrasprawa chromatografia cieczowa

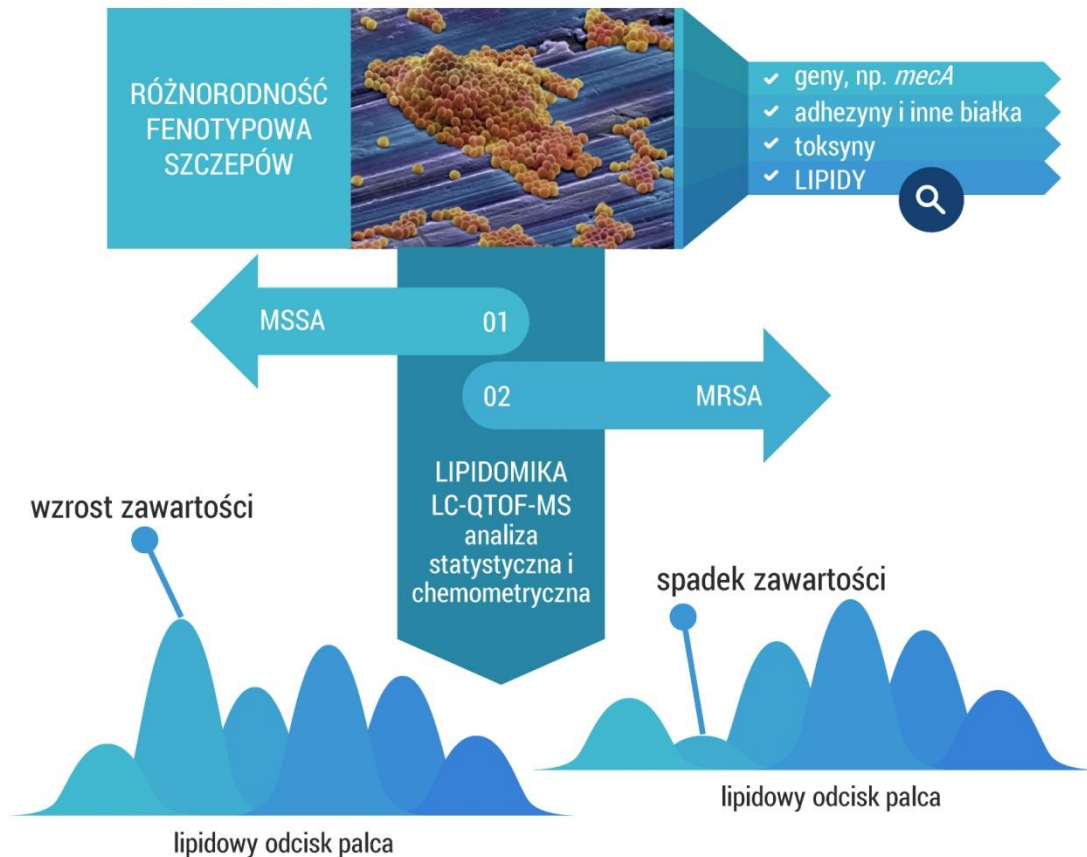


WPROWADZENIE

2 Wprowadzenie

Pojawienie się nowych rozwiązań w zakresie instrumentacji oraz metodyk analitycznych, szczególnie dotyczących wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas umożliwiło dynamiczny rozwój nauk –omicznych, w tym lipidomiki. Dostępne narzędzia analityczne w połączeniu z technikami chemometrycznymi i statystycznymi umożliwiają przeprowadzenie analiz próbek biologicznych i wyodrębnienie informacji na temat powiązania składu chemicznego ze stanem komórki bądź organizmu, a co za tym idzie identyfikację biomarkeru, np. stanu chorobowego. W tym kontekście możliwe stało się również przeprowadzenie porównawczych analiz lipidomicznych ekstraktów lipidów mikroorganizmów charakteryzujących się zróżnicowanym fenotypem, także w odniesieniu do zagadnienia oporności i wrażliwości na antybiotyki. Wskazanie zmian lipidomicznych pomiędzy szczepami wrażliwymi i opornymi na antybiotyki może być pomocne w zrozumieniu mechanizmu oporności mikroorganizmów na różnej klasy antybiotyki (Rysunek 1).

Jedną z najczęstszych przyczyn zakażeń szpitalnych oraz pozaszpitalnych jest gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*). Ten agresywny patogen może powodować szereg jednostek chorobowych, począwszy od ropnych infekcji skórnych po zagrażającą życiu ludzkiemu sepsę¹. Występująca oporność *S. aureus* na antybiotyki, często jednocześnie na antybiotyki różnego rodzaju (wielolekooporność), znacząco obniża możliwości leczenia zakażeń tym patogenem^{2,3}. Co więcej, infekcje wywoływane przez szczepy *S. aureus* odporne na antybiotyki (MRSA) są trudniejsze i bardziej kosztowne w leczeniu, częściej wymagają hospitalizacji i prowadzą do śmierci niż w przypadku infekcji powodowanych przez szczepy *S. aureus* wrażliwe na antybiotyki (MSSA)⁴. Według raportu opublikowanego przez Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorobom (CDC) w Stanach Zjednoczonych w 2011 roku odnotowano 80,461 infekcji spowodowanych przez MRSA, przy czym ponad 11 tysięcy z nich zakończyło się śmiercią zakażonych pacjentów⁴. Trudności w leczeniu zakażeń *S. aureus* oraz rozwijająca się oporność na pojawiające się coraz to nowsze antybiotyki jest przyczyną poszukiwań kolejnych celów dla skutecznej antybiotykoterapii i pogłębiania wiedzy na temat mechanizmów powstawania zjawiska oporności na antybiotyki.



Rysunek 1. Koncepcja niecelowanej analizy lipidomicznej w kontekście poszukiwania różnic fenotypowych na poziomie lipidów pomiędzy szczepami gronkowca złocistego opornymi i wrażliwymi na antybiotyki.

Znanych jest wiele czynników odpowiedzialnych za występowanie fenotypu gronkowca złocistego opornego na antybiotyki, m.in. obecność genu *mecA*, różnych adhezyn, toksyn czy enzymów. Szczepy *S. aureus* odporne i wrażliwe na antybiotyki różnią się również stopniem patogenności czy wirulencji^{5,6}. W ostatnich latach szczególną uwagę poświęcono na badanie proteomu gronkowca złocistego i szukanie różnic w zawartości białek pomiędzy szczepami opornymi i wrażliwymi na antybiotyki⁷⁻⁹. Wykazano również, że oporność *S. aureus* na antybiotyki takie jak metycylina, daptomycyna, gentamycyna czy kwas fusydowy może być związana ze zmianami w składzie lipidów błonowych¹⁰⁻¹⁴. Jednak rola lipidów w procesie kształtowania się oporności na antybiotyki u szczepów tej bakterii wciąż jest niejasna. W tym kontekście celowym jest uzupełnienie wiedzy na temat różnic pomiędzy szczepami gronkowca złocistego na poziomie metabolizmu lipidów.



CZĘŚĆ LITERATUROWA

3 Część literaturowa

3.1 Lipidy

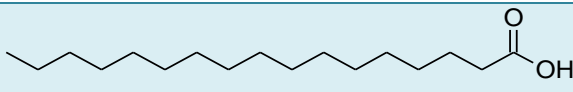
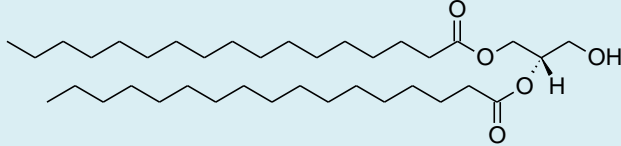
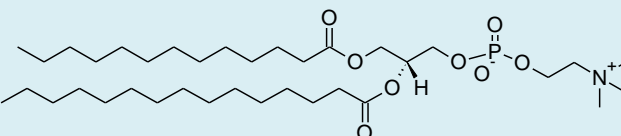
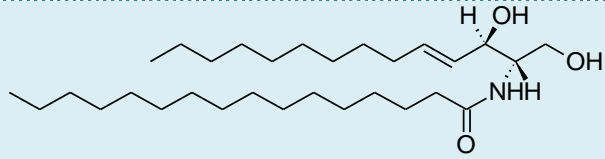
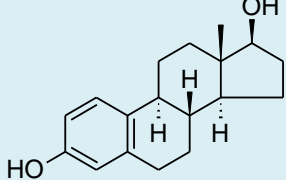
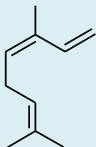
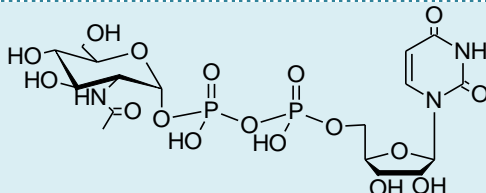
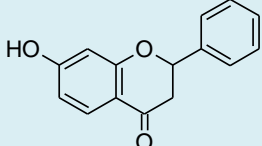
Lipidy obejmują grupę związków chemicznych o zróżnicowanej strukturze chemicznej i funkcjach. Ze względu na strukturalną różnorodność tych cząsteczek chemicznych ich klasyfikacja nie jest prosta. W 2005 roku powstał międzynarodowy system nazewnictwa oraz klasyfikacji lipidów, według którego, lipidy zdefiniowano jako hydrofobowe bądź amfipatyczne cząsteczki powstające całkowicie lub częściowo w wyniku kondensacji tioestrów (kwasy tłuszczowe, glicerolipidy, glicerofosfolipidy, sfingolipidy, sacharolipidy i poliketydy) lub/oraz poprzez kondensację podjednostek izoprenowych (prenole i sterole)^{15,16}. Zgodnie z systemem klasyfikacji *LIPID MAPS* (<http://www.lipidmaps.org/>) lipidy są przyporządkowane do ośmiu kategorii, które w swoim obrębie dzielą się na klasy, następnie na podklasy, a także w przypadku niektórych prenoli na klasy czwartego poziomu¹⁷. Klasyfikacja lipidów oparta została na właściwościach chemicznych lipidów, tj. na zawartości hydrofobowych oraz hydrofilowych elementów cząsteczki lipidu. Osiem głównych kategorii obejmuje acyle tłuszczowe (FA), glicerolipidy (GL), glicerofosfolipidy (GP), sfingolipidy (SP), sterole (ST), prenole (PR), sacharolipidy (SL) i poliketydy (PK). Przykładowe struktury i klasy lipidów należących do wyżej wymienionych kategorii zawarto w Tabeli 1. Konsorcjum *LIPID MAPS* zaproponowało również ujednoczenie nazewnictwa lipidów poprzez stosowanie odpowiednich członów w nazwie lipidu, m.in: *sn*, określającego położenie podstawników radylowych w glicerolipidach oraz glicerofosfolipidach; *E/Z*, określającego geometrię wiązań podwójnych obecnych w cząsteczce lipidu; *lyso*, określającego położenie brakującego podstawnika radylowego w cząsteczce lipidu, a także stosowanie skrótów, takich jak DG (30:0) czy TG (32:3), określających klasę lipidu, całkowitą liczbę atomów węgla w podstawnikach radylowych oraz liczbę wiązań podwójnych w strukturze lipidu.

W kontekście analityki chemicznej istotna jest klasyfikacja lipidów ze względu na polarność oraz różnice we właściwościach kwasowo-zasadowych tych związków chemicznych. Ze względu na polarność, lipidy można scharakteryzować jako polarne (np. glicerofosfolipidy) lub niepolarne (triacyloglicerole, diacyloglicerole, cholesterol i jego pochodne). Ze względu na różnice we właściwościach kwasowo-zasadowych, lipidy można sklasyfikować jako¹⁸:

- lipidy o charakterze kwasowym posiadające ładunek ujemnym w środowisku zasadowym (ang. *weak anionic lipids*), np. glicerofosfoetanolamina, eikozanoidy, ceramidy,
- lipidy o charakterze kwasowym posiadające ładunek ujemny w środowisku o pH fizjologicznym (ang. *anionic lipids*), np. kardiolipina, sulfatydy, glicerofosfoinozytol, glicerofosfoseryna, glicerofosfoglicerol, kwas fosfatydowy,
- lipidy o charakterze obojętnym posiadające ładunek obojętny w pH fizjologicznym, np. triacyloglicerole, glikolipidy, glicerofosfocholina,
- inne, nie sklasyfikowane w żadnej z powyższych grup, np. sterole.

Lipidy pełnią wiele istotnych i unikalnych funkcji biologicznych, które mają na celu zachowanie w komórce homeostazy. Cechują się one wysokim stopniem specjalizacji w specyficznych kompartmentach komórkowych, gdzie pełnią określone role. Przede wszystkim są one głównym składnikiem strukturalnym błon komórkowych, a więc wpływają na takie właściwości błony komórkowej jak jej płynność czy krzywizna, a także wszelkiego typu oddziaływania mające miejsce w błonie. Ponadto, lipidy uczestniczą w procesach transportu oraz magazynowania energii oraz przesyłania sygnałów w komórce. Zachowanie stężenia poszczególnych lipidów budujących struktury komórkowe czy uczestniczących w szlakach przesyłania sygnałów komórkowych jest kluczowa dla zachowania komórkowej homeostazy i podlega ścisłej regulacji przez metabolizm lipidów. Dlatego też, zmiany czy defekty w metabolizmie lipidów powiązano z patogenezą chorób takich jak cukrzyca¹⁹, otyłość²⁰, miażdżyca²¹ czy choroba Alzheimera²². Skład jakościowy oraz ilościowy lipidów komórkowych może być również powiązany z występowaniem różnych cech fenotypowych mikroorganizmów. Różnice w zawartości lipidów komórkowych wykazano przede wszystkim pomiędzy komórkami bakteryjnymi czy grzybowymi opornymi i wrażliwymi na różnorodne chemoterapeutyki, ale również hodowanymi w różnych warunkach laboratoryjnych^{11,23–27}. Wskazuje to na istotną rolę lipidom w adaptacji komórek mikroorganizmów do zmieniających się warunków życia oraz w występowaniu zjawiska oporności na antybiotyki.

Tabela 1. Kategorie lipidów wraz z przykładowymi strukturami oraz klasami lipidów (według klasyfikacji *LIPID MAPS*).

kategoria	przykładowa struktura	przykładowe klasy lipidów
acyle tłuszczowe	 kwas heptadekanowy	kwasy tłuszczowe, eikozanoidy, alkohole tłuszczowe, estry tłuszczowe, amidy tłuszczowe
glicerolipidy	 1,2-diheptadekanoilo- <i>sn</i> -glicerol	monoradyloglicerole, diradyloglicerole, triradyloglicerole
glicerofosfolipidy	 1-tridekanoilo-2-pentadekanoilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocholina	glicerofosfocholiny, glicerofosfoetanolaminy, glicerofosfoseryny, glicerofosfoglicerole, glicerofosfoglicerofosforany, glicerofosfoinozytyle, glicerofosfoglicerofosfoglicerole
sfingolipidy	 N-(heksadekanoilo)-tetradekasfing-4-enina	zasady sfingoidowe, ceramidy, fosfosfingolipidy, neutralne glikosfingolipidy, kwasowe glikosfingolipidy
sterole	 estra-1,3,5(10)-trien-3,17β-diol	sterole, cholesterol i jego pochodne, steroidy, kwas żółciowy i jego pochodne
prenole	 3,7-dimetylo-1,3Z,6-oktatrien	izoprenoidy, chinony, hydrochinony, poliprenole
sacharolipidy	 UDP-N-acetylo-α-D-glukozamina	acyloaminocukry, glikany acyloaminocukrów, acylorehalozy, glikany acylotrahlozów
poliketydy	 7-hydroksyflawanon	poliketydy makrolidowe, poliketydy aromatyczne, hybrydy nierybosomalnych peptydów i poliketydów

3.1.1 Struktura i funkcje lipidów gronkowca złocistego

Lipidom gronkowca złocistego stanowią głównie fosfatydyloglicerole (PGs), diacyloglicerole (DGs), lizylofosfatydyloglicerole (Lys-PGs) diglukozylodiacyloglicerole (Glc-Glc-DGs), monoglukozylodiacyloglicerole (Glc-DGs) oraz kardiolipiny (CLs) ²⁸⁻³¹. Strukturę głównych lipidów występujących w komórkach gronkowca złocistego przedstawiono w Tabeli 2. Wymienione lipidy są przede wszystkim składnikami budulcowymi błony komórkowej, dlatego też struktura oraz funkcjonowanie błony komórkowej jest powiązane ze składem jakościowym oraz ilościowym lipidów błonowych. Równowaga w składzie lipidowym błony komórkowej wpływa również na odpowiednie rozmieszczenie białek błonowych, a w konsekwencji na transport przez błonę, replikację DNA i podział komórkowy ³². Zmiany w przepuszczalności błony komórkowej, wynikające z modyfikacji jej struktury mogą być związane ze zmniejszonym wnikaniem antybiotyków do wnętrza komórki ³³. Badania sugerują również, że stabilność błony komórkowej zależna jest od utrzymania odpowiedniego stosunku glikolipidów w błonie: diglikozylodiacylogliceroli, tworzących dwuwarstwę błonową do monoglikozylodiacylogliceroli, rozluźniających strukturę dwuwarstwy lipidowej ³⁴. Ponadto, zmiany w składzie lipidów obojętnych takich jak MGDG, DGDG i DG, lipidów anionowych, takich jak PG czy kationowych jak Lys-PG, również mogą prowadzić do zmienionej przepuszczalności błony na skutek modyfikacji ładunku powierzchniowego błony. Zwiększoną zawartość Lys-PG wykazano w przypadku szczepów gronkowca złocistego opornego na daptomycynę oraz gentamycynę ^{11,12}.

Fosfatydyloglicerol oraz diglukozylodiacyloglicerol są również prekursorami kwasu lipotejchojowego (LTA), który jest składnikiem ściany komórkowej bakterii gram-dodatnich ^{35,36}. LTA typu I gronkowca złocistego zbudowany jest z 1,3-poliglicerolofosforanu przyłączonego do glikolipidu β -gentiobiozodiacyloglicerolu, który zakotwicza LTA w błonie komórkowej. Łańcuch poliglicerolofosforanowy składa się z 15 do 50 jednostek glicerolofosforanowych (Gro-P).

Zawartość poszczególnych klas lipidów, podobnie jak i rodzaj kwasów tłuszczowych stanowiących łańcuchy boczne lipidów (liczba atomów węgla, liczba wiązań podwójnych, obecność lub brak rozgałęzienia) w komórkach gronkowca złocistego, zależy od wielu czynników, m.in. fazy wzrostu komórek bakteryjnych oraz warunków hodowli ^{13,25}.

Tabela 2. Struktury chemiczne głównych klas lipidów komórkowych gronkowca złocistego.

Nazwa	Struktura
fosfatydyloglicerole	
diacyloglicerole	
monoglukozyldiacyloglicerole	
diglukozyldiacyloglicerole	
lizylofosfatydyloglicerole	
kardiolipiny	

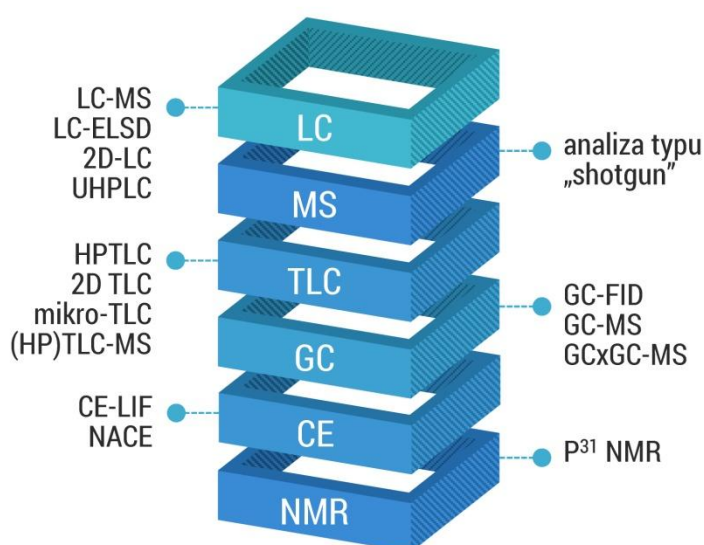
R₁, R₂ – reszty kwasów tłuszczowych.

Łańcuchy boczne lipidów gronkowca złocistego mogą być nierozgałęzione (SCFAs), bądź zawierać rozgałęzienia (BCFAs) typu *iso*-, *anteiso*-. Wykazano, że zawartość lipidów z łańcuchami bocznymi zawierającymi rozgałęzienia oraz stosunek zawartości kwasów tłuszczowych *iso*- oraz *anteiso*- jest zależna od temperatury i ma wpływ na płynność błony komórkowej^{37,38}. Według danych literaturowych kwasy tłuszczowe o rozgałęzieniu typu -

anteiso oraz o liczbie atomów węgla równej 15 są dominujące w lipidach gronkowca złocistego³⁸.

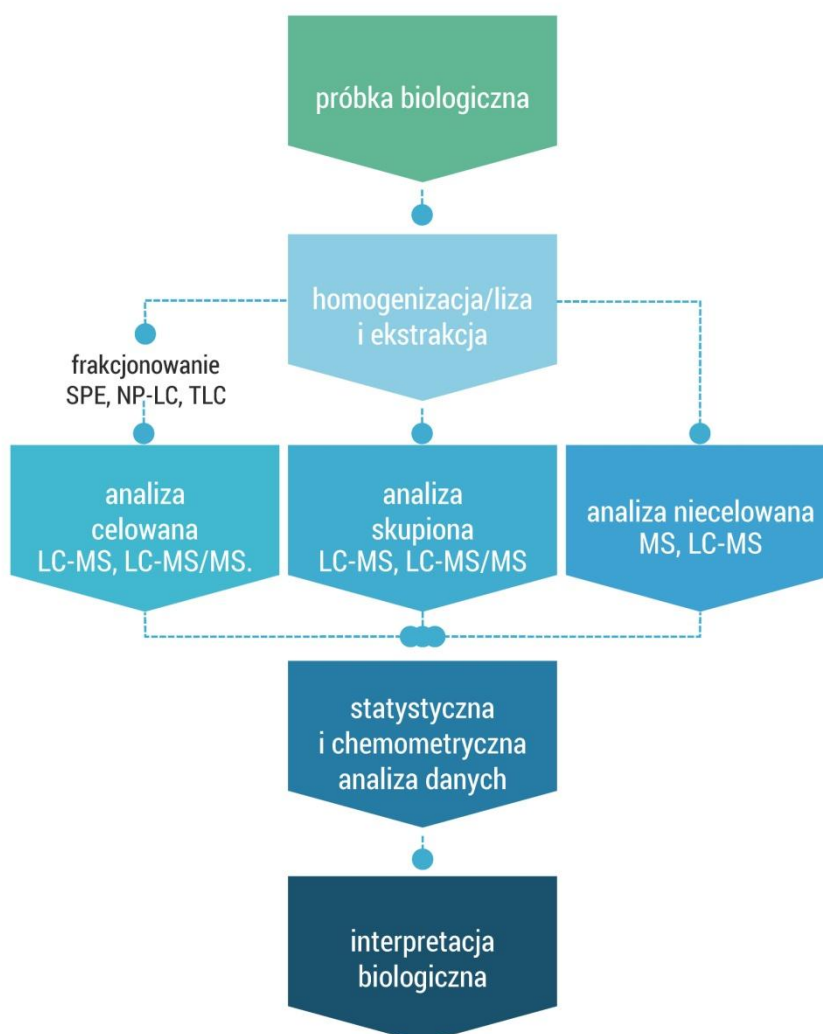
3.2 Techniki analityczne stosowane w badaniach lipidomicznych

Wzrost zainteresowania analizą lipidów spowodował wyodrębnienie nowej dziedziny nauki -lipidomiki³⁹. Uznawana za „gałąź” metabolomiki, lipidomika, może być zdefiniowana jako nauka zajmująca się badaniem i charakterystyką lipidów oraz ich biologicznych funkcji, z uwzględnieniem ekspresji białek zaangażowanych w metabolizm lipidów w komórce, tkance czy płynach ustrojowych. W zakresie badań medycznych, analizy lipidomiczne mogą doprowadzić do wskazania lipidowego biomarkera w odniesieniu do ryzyka czy diagnozy zachorowania na daną chorobę oraz efektywności stosowanego leczenia. Ponadto dostarczają wiedzy na temat mechanizmów zaburzeń metabolicznych w przypadku badanej jednostki chorobowej. Nowoczesne narzędzia analityczne umożliwiają wykrycie oraz oznaczenie nawet kilkuset cząsteczek lipidów w trakcie jednego cyklu analitycznego. Ze względu na duże strukturalne zróżnicowanie lipidów, analiza tych związków chemicznych jest sporym wyzwaniem dla chemików analityków. W zakresie opracowywania nowych metodyk analitycznych w lipidomice dąży się do różnych celów, od których zależy wybór stosowanych technik analitycznych oraz wymagania stawiane opracowywanej metodzie analitycznej i wykorzystywanej aparaturze. Zestawienie rozwiązań analitycznych w zakresie technik analitycznych stosowanych w badaniach lipidomicznych przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Zestawienie technik analitycznych wykorzystywanych w lipidomice.

Dostępne dane literaturowe wskazują, że najczęściej badania lipidomiczne opierają się na technice spektrometrii mas sprzężonej z technikami rozdzielania mieszanin, jak HPLC, które umożliwiają szybkie i czułe wykrywanie cząsteczek lipidów o zróżnicowanej strukturze w różnych matrycach biologicznych. Wyjątkowo intensywny rozwój lipidomiki zaobserwowano po wprowadzeniu miękkich technik jonizacji analitów z użyciem rozpylania cieczy w polu elektrycznym (ESI) oraz jonizacji przez desorpcję laserową wspomaganą przez matrycę (MALDI). Nowoczesne rozwiązania analityczne w zakresie instrumentacji, w szczególności w rozwoju spektrometrii mas oraz pojawienie się nowych procedur analitycznych stworzyły ogromne możliwości w obszarze oznaczania lipidów komórkowych. Na Rysunku 3 przedstawiono w sposób schematyczny etapy badania lipidomicznego wraz z informacjami na temat najczęściej stosowanych w lipidomice technik analitycznych.



Rysunek 3. Schemat analizy lipidomicznej z uwzględnieniem najczęściej stosowanych technik analitycznych.

3.2.1 Techniki przygotowania próbki w lipidomice

Pierwszym etapem analizy lipidomicznej jest ekstrakcja lipidów z matrycy pochodzenia biologicznego, charakteryzujących się złożonym składem. Na tym etapie usunięte zostają substancje przeszkadzające w oznaczeniu jakościowym i ilościowym lipidów, tj. białka, cukry i inne substancje małowcząsteczkowe. Do ekstrakcji lipidów z próbek biologicznych stosuje się najczęściej metody oparte na dwóch technikach: ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE) oraz ekstrakcji do fazy stałej (SPE).

W praktyce laboratoryjnej do ekstrakcji lipidów wykorzystuje się zwykle mieszaninę metanolu i chloroformu (2:1 v/v). Metoda ta została wprowadzona przez Folcha i współpracowników⁴⁰ i zmodyfikowana później przez Bligh i Dyer'a (dodatek wody i kwasu octowego do mieszaniny ekstrakcyjnej)⁴¹. Metoda ta pozwala na szybką i efektywną izolację zarówno lipidów o charakterze polarnym, jak i niepolarnym. Rzadziej wykorzystywane są również rozpuszczalniki takie jak eter *tert*-butylo-metylowy (MTBE)⁴², mieszanina butanolu i metanolu (BUME)⁴³ czy mieszanina heksanu i izopropanolu (3:2 v/v)⁴⁴. Rozpuszczalniki inne niż chloroform cechują się mniejszą toksycznością, przy czym efektywność ekstrakcji z ich użyciem jest podobna lub wyższa niż w przypadku metody Folcha.

Technika SPE w badaniach lipidomicznych nie jest tak powszechnie wykorzystywana jak technika ekstrakcji ciecz-ciecz^{45,46}. Do ekstrakcji lipidów za pomocą techniki SPE stosuje się głównie fazy stacjonarne oraz eluenty używane w chromatografii w układzie faz normalnych, czyli żel krzemionkowy niemodyfikowany oraz modyfikowany grupami -CN, -NH₂, i diolowymi oraz metanol, heksan i chloroform jako eluenty. W porównaniu do techniki LLE, stosowanie techniki SPE umożliwia redukcję zużycia rozpuszczalników, natomiast może być problematyczna w przypadku próbek o dużej objętości, ponieważ uzyskiwany odzysk lipidów jest zdecydowanie niższy ze względu na niską pojemność sorpcyjną tej techniki.

Wybór optymalnej techniki przygotowania próbki zależy przede wszystkim od obranej strategii analitycznej oraz celu badawczego, który planuje się osiągnąć. Technika ekstrakcji ciecz-ciecz, która umożliwia jednoczesną ekstrakcję lipidów wielu klas jest szczególnie przydatna w przypadku analizy niecelowanej. Natomiast, dzięki zastosowaniu techniki SPE możliwa jest ekstrakcja lipidów wybranych klas.

Zdecydowanie rzadziej stosowanymi technikami do ekstrakcji lipidów są: mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)⁴⁷, ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (UAE)⁴⁸, dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz (DLLME)⁴⁹.

3.2.2 Strategie analityczne w lipidomice w oparciu na spektrometrii mas

W badaniach lipidomicznych wyróżnia się trzy strategie analityczne: analizę niecelowaną (ang. *untergeted lipidomics*), celowaną (ang. *targeted lipidomics*) oraz skupioną (ang. *focused lipidomics*)⁵⁰. Analizy niecelowane są wykonywane w celu wykrycia wszystkich lipidów obecnych w próbce powyżej granicy wykrywalności. Główną zaletą analizy niecelowanej jest możliwość wskazania oraz zidentyfikowania nowych cząsteczek, bez posiadania wiedzy na temat składu jakościowego próbki, przy czym jedynym ograniczeniem co do liczby i rodzaju identyfikowanych związków chemicznych jest zastosowana technika detekcji oraz przygotowania próbki. Analizę niecelowaną przeprowadza się zazwyczaj z wykorzystaniem wysokorozdzielczych spektrometrów mas, takich jak Q-TOF⁵¹, Q-IT⁵² czy FT-MS⁵³, umożliwiającymi uzyskanie wartości stosunku masy do ładunku (m/z) wykrywanych analitów z dokładnością do 0.0001 amu (w wyniku zastosowania trybu przemieszczania widm jonów w danym zakresie wartości m/z – tryb SCAN). Pozwala to na rozdzielenie analitów o takiej samej masie nominalnej oraz ułatwia ich późniejszą identyfikację poprzez przeszukiwanie baz lipidów na podstawie uzyskanej dokładnej wartości m/z . Zastosowanie tej strategii analitycznej jest niezwykle przydatne w przypadku lipidomicznych analiz porównawczych, przy czym generowana liczba danych zapisywanych w trakcie analizy jest tak duża, że wymaga ona zastosowania zaawansowanych technik chemometrycznych w celu wyodrębnienia informacji na temat różnic lipidomicznych pomiędzy badanymi próbkami. Uzyskiwane w trakcie analizy niecelowanej lipidowe odciski palca (ang. *lipid fingerprints*) umożliwiają również klasyfikację analizowanych próbek. Wadą tego typu podejścia analitycznego jest często niska czułość spektrometru mas ze względu na uzyskiwane tło oraz brak możliwości oznaczenia ilościowego wykrywanych analitów.

W przeciwieństwie do lipidomiki niecelowanej, w strategiach lipidomiki celowanej oraz skupionej głównym celem prowadzonych badań jest analiza wybranych związków chemicznych o znanej strukturze. Analiza celowana, dzięki wykorzystaniu wysoce czułej techniki tandemowej spektrometrii mas umożliwia oznaczenie lipidów na bardzo niskim poziomie zawartości w próbce, jednak wymaga zastosowania wzorców oznaczanych lipidów.

Analiza prowadzona jest w trybie monitorowania wybranych reakcji jonów (SRM, bądź MRM), co wymaga znajomości struktury oznaczanych analitów, ale zapewnia uzyskanie wysokiej czułości, a w konsekwencji możliwość oznaczenia lipidów występujących w próbce na niskich poziomach zawartości. Do prowadzenia analizy celowanej najczęściej wybieranym analizatorem mas jest potrójny kwadrupol (QQQ)^{54,55}.

Analiza skupiona polega na identyfikacji i/lub oznaczaniu lipidów, należących do tej samej kategorii lipidów i posiadających w swojej strukturze charakterystyczny fragment (np. fosfocholina w fosfatydylocholinie). Podczas prowadzenia analizy skupionej z wykorzystaniem techniki tandemowej spektrometrii mas można wykrywać charakterystyczne fragmenty cząsteczki lipidu powstające w wyniku fragmentacji jonu pseudomolekularnego. Spektrometr mas (najczęściej wyposażony w kwadrupolowy analizator czasu przelotu⁵⁶ oraz kwadrupolową pułapkę jonową⁵⁷) może pracować w trybie przemiatania widm jonów potomnych (ang. *product ion scanning*), przemiatania widm jonów macierzystych (ang. *precursor ion scanning*), bądź przemiatanie widm jonów powstałych na skutek utraty obojętnej części cząsteczki (ang. *neutral loss scanning*). Dzięki zawężeniu oznaczanych analitów do wybranej klasy bądź podklasy lipidów, strategia ta charakteryzuje się wyższą czułością niż strategia lipidomiki niecelowanej, przy czym umożliwia śledzenie zmian w zawartości większej liczby lipidów niż w podejściu lipidomiki celowanej w trakcie jednego cyklu analitycznego.

3.2.3 Wysokosprawna chromatografia cieczowa w lipidomice

W badaniach lipidomicznych, w celu rozdzielenia mieszaniny lipidów obecnych w ekstrakcie, często korzysta się z techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Przeprowadzenie procesu rozdzielenia chromatograficznego pozwala na wykrycie oraz oznaczenie izomerów oraz izobarów lipidów, co nie jest możliwe w przypadku analizy lipidów poprzez bezpośrednie wprowadzenie ekstraktu lipidów do komory jonizacyjnej spektrometru mas. Intensywny rozwój nowych technologii wypełnień kolumn chromatograficznych, szczególnie ultrasprawnych kolumn chromatograficznych oraz kolumn wyprodukowanych w technologii *core-shell*, pozwolił na udoskonalenie metod analizy lipidów opierających się na wysokosprawnej chromatografii cieczowej, szczególnie w zakresie uzyskiwanej rozdzielczości, ale także czasu prowadzenia analizy i zużycia rozpuszczalników. Technika ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) zazwyczaj w połączeniu z techniką

spektrometrii mas jest obecnie niezwykle popularna w obszarze analityki lipidów, stosowana zarówno w analizach niecelowanych, jak i celowanych^{51,55,58}. Stosowane w lipidomice rozwiązania instrumentalne obejmują również techniki kapilarnej chromatografii cieczowej⁵⁹ czy nano-LC⁶⁰, które umożliwiają uzyskanie większej czułości wykrywania cząsteczek lipidów obecnych w próbkach o bardzo małej objętości.

Rozdzielenie mieszaniny lipidów zazwyczaj wykonuje się stosując wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz^{61,62}, rzadziej w normalnym układzie faz⁶³. Analiza chromatograficzna w odwróconym układzie faz prowadzona z wykorzystaniem ultrasprawnej kolumny chromatograficznej wypełnionej fazą stacjonarną o średnicy ziarna rzędu 1,7 μm umożliwia rozdzielenie lipidów różniących się liczbą atomów węgla oraz wiązań podwójnych w resztach kwasów tłuszczowych w obrębie danej klasy lipidów, jak i również cząsteczek izobarycznych (w tym izomerów lipidów)⁶¹. Zastosowanie podwyższonej temperatury i fazy ruchomej o dużej sile elucyjnej zapewnia elucję nawet silnie hydrofobowych cząsteczek takich jak triacyloglicerole. Analiza w normalnym układzie faz prowadzona jest zazwyczaj w celu rozdzielenia (frakcjonowania) mieszaniny lipidów pod względem przynależności do danej klasy (rodzaju polarnej części struktury lipidu). W ostatnich latach do oznaczeń lipidów wykorzystano również dwuwymiarową wysokosprawną chromatografię cieczową⁶⁴, w której mieszanina lipidów ulegała rozdzielaniu najpierw w normalnym układzie faz, a następnie w odwróconym układzie faz. Zastosowanie techniki 2D LC-MS pozwala na zwiększenie rozdzielczości układu chromatograficznego. Niedawno pojawiły się również doniesienia o możliwości stosowania układu HILIC w celu rozdzielenia lipidów^{65,66}.

Z powodu niewielkiej zdolności cząsteczek lipidów do absorpcji światła w zakresie światła widzialnego oraz ultrafioletu (UV-Vis), detektory UV-Vis rzadko są wykorzystywane do ich wykrywania. Zwykle analizy lipidomiczne prowadzone są przy użyciu techniki HPLC sprzężonej ze spektrometrem mas, gdyż technika MS charakteryzuje się istotnymi dla badań lipidomicznych parametrami metrologicznymi takimi jak wysoka rozdzielczość (rzędu 20 000 FWHM), wysoka czułość (rzędu ng/mL) i dokładność pomiaru masy ($\Delta\text{ppm} < 5$ ppm). Połączenie techniki HPLC i ESI-MS znalazło zastosowanie w analizie lipidomicznej różnego typu próbek biologicznych: krwi^{67,68}, komórek⁶⁹ czy tkanek⁷⁰. Innymi stosowanymi detektorami w analityce lipidów są detektory światła rozproszonego (ELSD)⁷¹ i detektory fluorescencyjne⁷². Jednakże te detektory nie posiadają wystarczającej czułości ani

selektywności, a ponadto zastosowanie detektora fluorescencyjnego możliwe jest jedynie po przeprowadzeniu lipidów we fluorescencyjne pochodne. Dlatego też, ich wykorzystanie w analizie lipidów jest ograniczone. W Tabeli 3 zestawiono kluczowe informacje literaturowe na temat przykładowych metodyk oznaczania lipidów w próbkach biologicznych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas, z uwzględnieniem zastosowanych warunków chromatograficznych oraz analizatorów mas.

Tabela 3. Zestawienie informacji literaturowych na temat oznaczania lipidów w próbkach biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas.

Anality	Próbka	Typ analizatora mas	Kolumna chromatograficzna	Faza ruchoma ^a	Literatura
lipidom ludzki	surowica	Q-TOF	Discovery HS C18 2,1x150 mm, 3 μm	A: H ₂ O + 0,1% kwas mrówkowy B: ACN + 0,1% kwas mrówkowy	73
sfginolipidy	surowica	QQQ	XBridge C8 2,1x30 mm, 3,5 μm	A: MeOH/H ₂ O/CHCl ₃ / kwas mrówkowy (55:40:5:0,4 v/v) B: MeOH/ACN/CHCl ₃ / kwas mrówkowy (48:48:4:0,4 v/v).	74
ceramidy	skóra	Q-TOF	XBridge BEH C18 Shield 2,1x100 mm, 1,8 μm	A: 20 mM mrówczan amonu pH 5,0 B: MeOH	75
lipidom bakteryjny	hodowla bakteryjna	LTQ	Ascentis Si HPLC 1,0x150 mm, 3 μm	A: H ₂ O/ACN/MeOH (10/55/35 v/v) + 10mM octan amonu B: ACN/MeOH (60/40 v/v) + 10 mM octan amonu.	26
lipidom ludzki	surowica	Q-TOF	XBridge BEH C18 shield 1,0x 2,1 mm, 1,7 μm	A: 20 mM mrówczan amonu pH 5,0 B: MeOH	61
lipidom bakteryjny	hodowla bakteryjna	Q-TOF	XBridge C18, 2,1x150 mm, 3,5 μm	A: 5mM octan amonu w mieszaninie metanol/woda (99/1 v/v) B: 5 mM octan amonu w mieszaninie heksan/izopropanol/woda (20/79/1 v/v)	76
kwasy żółciowe	surowica, osocze, mocz	LTQ-FT	XBridge C18, 2,1x50 mm, 2,5 μm	A: MeOH/2 mM octan amonu pH 7,0 (5/95 v/v) B: 2 mM octan amonu w MeOH	77
fosfolipidy	mocz	Q-TOF	Synergi RP 0,300x150 mm, 4 μm	A: H ₂ O + 0,2% kwas mrówkowy B: THF	78
fosfolipidy	komórki ludzkie (monocyty)	LTQ	Deverosil C30, 0.3x150 mm	ACN/MeOH/TEA (25/75/1 v/v) + 0,3% kwas mrówkowy, pH 6,8	57

^a A - faza ruchoma A, B – faza ruchoma B.

3.2.4 Oznaczenia lipidów w materiale biologicznym z wykorzystaniem techniki bezpośredniego wprowadzenia ekstraktu lipidów do komory jonizacyjnej spektrometru mas

W ostatnich latach dużą popularnością cieszą się procedury analityczne, w których wykorzystuje się bezpośrednio wprowadzenie ekstraktu lipidów (z pominięciem etapu rozdzielania np. technikami chromatograficznymi) do komory jonizacyjnej spektrometru mas, tzw. *shotgun lipidomics*³⁹. Metody analityczne oparte na tej technice charakteryzują się wysoką dokładnością, odtwarzalnością, czułością, a ponadto są mniej czasochłonne niż inne metody analityczne i mogą być z powodzeniem stosowane zarówno w lipidomice niecelowanej, jak i celowanej. Metody oparte na bezpośrednim wprowadzeniu ekstraktu lipidów do komory jonizacyjnej spektrometru mas najczęściej wykorzystują źródło jonów typu elektrorozpylanie (ESI)^{79,80}, rzadziej jonizacji przez desorpcję laserową wspomaganą przez matrycę (MALDI)^{81,82}.

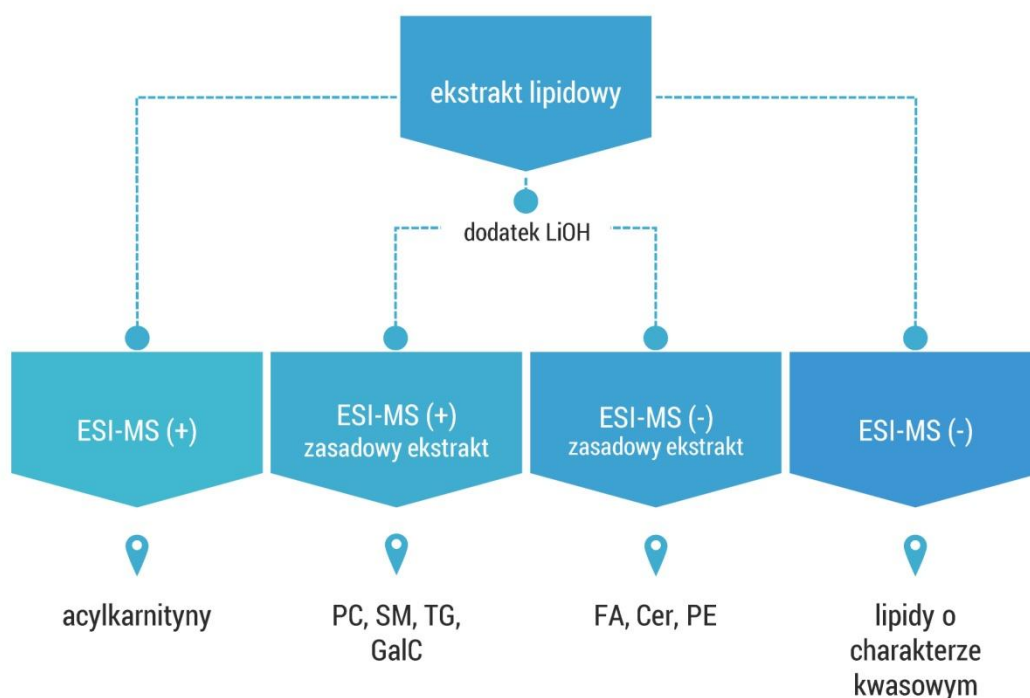
Rozdzielenie oraz oznaczenie lipidów poprzez bezpośrednie wprowadzenie ekstraktu lipidów do komory jonizacyjnej ESI-MS jest możliwe dzięki różnicom we właściwościach kwasowo-zasadowych lipidów i następuje w wyniku przełączania źródła jonów z trybu pracy tworzenia jonów dodatnio naładowanych na tworzenia jonów ujemnych lub zmiany pH rozpuszczalnika próbki³⁹. Schemat postępowania w tego typu analizie przedstawiono na Rysunku 4. Lipidy o charakterze kwasowym, takie jak kardiolipina, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloseryna, kwas fosfatydowy, sulfatydy rozpuszczone w chloroformie mogą być wykryte z wykorzystaniem techniki ESI-MS w trybie tworzenia jonów ujemnych. Dodatek LiOH do ekstraktu chloroformowego pozwala na wykrycie w trybie tworzenia jonów ujemnych glicerofosfolipidów etanoloaminy, wolnych kwasów tłuszczowych oraz ceramidów, natomiast w trybie tworzenia jonów dodatnich glicerofosfolipidów choliny, triacylogliceroli, sfingomieliny, galaktocerebrozydów. Wykorzystanie wysokorozdzielczego analizatora mas typu FTICR-MS, Q-TOF-MS czy LTQ Orbitrap MS pozwala na rozdzielenie lipidów o takiej samej nominalnej wartości m/z. Wadą tego typu rozwiązania analitycznego jest m.in. trudność w rozdzieleniu izomerów lipidów.

Han i współpracownicy zademonstrowali wykorzystanie źródła jonów typu elektrorozpylanie do analizy fosfolipidów w erytrocytach ludzkich⁸³, triacylogliceroli w tkankach serca szczurzego (wykorzystanie ESI-MS/MS pozwala na wykrycie 0,1 pikomola

cząsteczek TG)⁸⁴, a także plazmalogenu w tkankach mózgu ludzkiego⁸⁵, poprzez bezpośrednie wprowadzenia ekstraktu chloroformowego do komory jonizacyjnej MS.

W 2015 roku Surma i współpracownicy⁷⁹ przedstawili zautomatyzowaną platformę analityczną umożliwiającą oznaczenie 22 klas lipidów, w tym dwustu indywidualnych cząsteczek lipidów w osoczu krwi ludzkiej z wykorzystaniem techniki ESI-MS. Opracowana metodologia umożliwia analizę ilościową, dzięki zastosowaniu wzorców wewnętrznych lipidów badanych klas. Charakteryzuje się wysoką wydajnością (ponad 200 próbek na dzień) i odtwarzalnością (współczynnik zmienności < 10% dla większości oznaczanych lipidów).

Źródło jonów typu MALDI wykorzystano m.in. do analizy lipidów błonowych archaebakterii⁸¹ oraz sulfatydów w tkankach myszy⁸⁶ (wykorzystanie 9-aminoakrydyny) jako matrycy).



Rysunek 4. Schemat postępowania podczas wykonywania analizy metodą bezpośredniego wprowadzenia ekstraktu lipidów do komory jonizacyjnej typu ESI.

3.2.5 Inne wybrane techniki wykorzystywane w analityce lipidów w próbkach materiału biologicznego

Ogromna różnorodność strukturalna lipidów często wymusza zastosowanie kilku różnych technik analitycznych w celu identyfikacji oraz oznaczenia lipidów w próbkach

materiału biologicznego. Oprócz spektrometrii mas i wysokosprawnej chromatografii cieczowej, które są najpowszechniej używanymi technikami analitycznymi w lipidomice, w analizie lipidów stosuje się również takie techniki rozdzielania jak chromatografia cienkowarstwowa (TLC), chromatografia gazowa (GC), elektroforeza kapilarna (CE) oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), jako technikę detekcji.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) oraz wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (HPTLC) są doskonałymi narzędziami do wstępnego rozdzielania lipidów na poszczególne klasy lipidów. Cechują się prostotą, krótkim czasem wykonania analizy i niskim kosztem. Sprzężenie TLC ze spektrometrią mas typu MALDI-MS, ESI-MS czy DESI-MS pozwala na uzyskanie dużych możliwości identyfikacji lipidów, przez co technika TLC, HPTLC czy 2D TLC (HPTLC) znajduje zastosowanie w badaniach lipidomicznych, a w szczególności do analizy niecelowanej oraz identyfikacji glikolipidów i glicerofosfolipidów w próbkach pochodzenia biologicznego⁸⁷⁻⁸⁹. Sprzężenie techniki MALDI-MS oraz DESI-MS z TLC umożliwia jonizację lipidów, a następnie ich oznaczenie bezpośrednio z płytki TLC⁸⁹⁻⁹¹.

Oznaczanie lipidów z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej (GC-MS⁹², GC-FID⁹³, GCxGC-MS⁹⁴) najczęściej dotyczy wykrywania i analizy kwasów tłuszczowych w próbkach materiału biologicznego (m.in. osocze i surowica krwi ludzkiej). Ograniczenia w stosowaniu techniki GC w badaniach lipidomicznych wynikają przede wszystkim z cech fizykochemicznych lipidów, które są w większości nietlotne oraz ulegają degradacji w wysokiej temperaturze. Natomiast konieczność przeprowadzania lipidów w lotne pochodne powoduje często utratę informacji na temat struktury tych cząsteczek. Mimo tych wad, technika chromatografii gazowej znalazła zastosowanie do analizy glicerofosfolipidów, sfingolipidów, cholesterolu i steroidów w różnego rodzaju próbkach biologicznych⁹⁵⁻⁹⁸. Przygotowanie próbki do analizy lipidomicznej z zastosowaniem techniki GC zazwyczaj obejmuje ekstrakcję, wstępne rozdzielanie ekstraktu (poprzez wykorzystanie techniki TLC, HPTLC lub HPLC) i przeprowadzenie lipidów w lotne pochodne poprzez użycie odczynników derywatyzujących (np. bromek pentafluorobenzylu w N,N-diizopropylloetyloaminie czy mieszanina acetamidu N-metylo-N-trifluorotrimetylosilylu/jodku amonu/ditioerytritolu)

Stosowanie elektroforezy kapilarnej w badaniach lipidomicznych jest również ograniczone z dwóch powodów:

- ze względu na częste sprzężenie CE z detektorem UV, a lipidy wykazują słabą absorpcję światła w zakresie promieniowania UV,

- ze względu na stosowanie roztworów wodnych, a wiele lipidów ma hydrofobowy charakter i jest nierozpuszczalna w wodzie.

Pomimo tych ograniczeń technikę elektroforezy kapilarnej udało się z powodzeniem zastosować w analizie lipidów poprzez modyfikacje metodyczne takie, jak choćby użycie detektora fluorescencyjnego i znakowania fluorescencyjnego (CZE-LIF)⁹⁹ czy wykorzystanie niewodnych buforów elektroforetycznych (NACE)¹⁰⁰. Zastosowanie techniki CZE-LIF umożliwiło rozdzielanie oraz oznaczenie znakowanych fluorescencyjnie lipidów takich jak DG czy PI w lizacie komórkowym⁹⁹. Natomiast technika NACE sprzężona ze spektrometrią mas została wykorzystana do analizy glicerofosfolipidów wyekstrahowanych z tkanek różnych organów szczura¹⁰⁰.

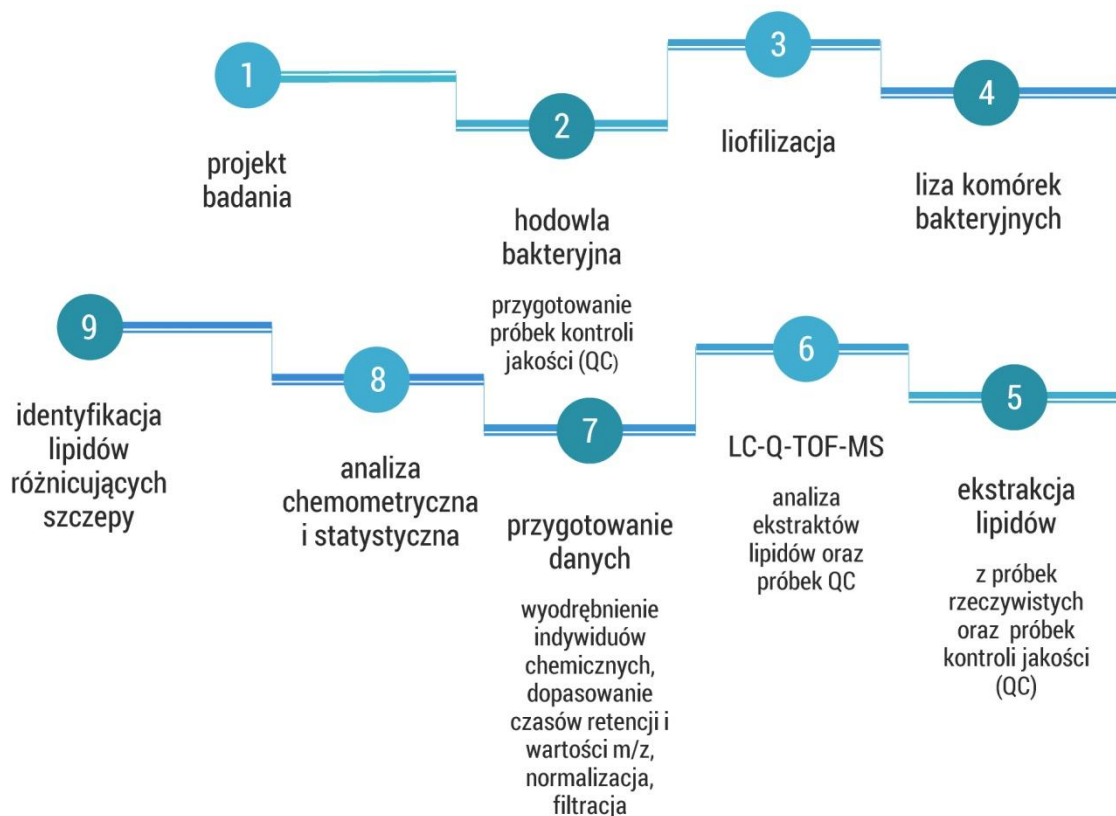
Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) nie jest powszechnie używana w badaniach lipidomicznych, a nieliczne zaprezentowane jej zastosowania w analizie lipidów dotyczą m.in. analizy lipidów w próbkach futra zwierzęcego (m.in. steroli)¹⁰¹, glicerofosfolipidów w próbkach tkanek pochodzenia zwierzęcego i roślinnego¹⁰² czy lipidów (w tym fosfolipidów) w próbkach komórek nowotworowych (HeLa)¹⁰³. Technika ³¹P NMR okazała się szczególnie przydatna w analizie jakościowej oraz ilościowej glicerofosfolipidów^{102,103}.

3.2.6 Techniki analityczne wykorzystywane do oznaczania lipidów gronkowca złocistego

Większość badań dotyczących analizy lipidów gronkowca złocistego ogranicza się do oznaczania zawartości kwasów tłuszczowych stanowiących łańcuchy boczne lipidów komórkowych *S. aureus*, bądź lipidów należących do danej klasy. Techniki analityczne, które były wykorzystywane do tej pory do analizy lipidów komórkowych *S. aureus* to przede wszystkim TLC^{13,104}, 2D TLC¹⁰, chromatografia kolumnowa¹⁰⁵ i GC (w tym GC-MS)²⁵. Wykorzystanie techniki TLC umożliwia rozdzielanie (frakcjonowanie) lipidów na klasy, które następnie mogą zostać poddane dalszej analizie kwasów tłuszczowych z użyciem techniki GC-FID³⁷, bądź analizie MS¹⁰⁶ w celu identyfikacji kwasów tłuszczowych obecnych w danej frakcji lipidów. Wymienione wyżej techniki nie umożliwiają jednak wykrycia oraz ilościowego oznaczenia lipidów *S. aureus* różnych klas, lipidów różniących się liczbą atomów węgla, stopniem nasycenia oraz obecnością rozgałęzień w obrębie danej klasy lipidów, ani izomerów lipidów.

3.3 Lipidomika niecelowana

Badanie lipidomiczne oparte na strategii analizy niecelowanej składa się z kilku etapów, które są identyczne jak w badaniach metabolomicznych, przy czym różnią się w obszarze stosowanych rozwiązań analitycznych. Dlatego też wiele standardowych procedur metabolomicznej analizy niecelowanej ¹⁰⁷, a w szczególności zasady dotyczące przeprowadzania poszczególnych jej etapów w celu uzyskania wiarygodnych wyników, można odnieść do badań lipidomicznych. Typowa procedura analizy niecelowanej obejmuje zaprojektowanie badania, przygotowanie próbki, analizę z wykorzystaniem różnych technik analitycznych oraz analizę wyników. Schemat przykładowej procedury analizy niecelowanej w lipidomice bakterii przedstawiono na Rysunku 5.



Rysunek 5. Schemat przykładowej procedury analitycznej w niecelowanej analizie lipidomu bakteryjnego.

W analizie niecelowanej niezwykle ważne jest zaprojektowanie badania: zaplanowanie eksperymentu biologicznego oraz wybranie adekwatnych technik analitycznych. W aspekcie porównawczych analiz niecelowanych, na etapie zbierania oraz

przygotowywania próbek istotne jest zastosowanie jednakowych warunków w odniesieniu do wszystkich próbek rzeczywistych, w tym również próbek kontroli jakości (QC) (np. warunków hodowli na etapie inkubacji komórek bakteryjnych).

Próbki kontroli jakości (QC) wykorzystuje się w badaniu –omicznym w celu określenia odtwarzalności metody analitycznej, określenia stabilności systemu LC-MS w trakcie trwania analizy sekwencji próbek oraz kalibracji danych poprzez korekcję zmienności w intensywności sygnału pomiędzy próbkami analizowanymi w różnych sekwencjach próbek^{108,109}. Próbki QC tworzy się poprzez spulowanie niewielkich (takich samych) objętości analizowanych próbek lub wybranej, reprezentatywnej części próbek, jeśli ich liczba jest zbyt duża.

3.3.1 Przygotowanie danych uzyskanych w wyniku analizy niecelowanej z wykorzystaniem techniki LC-MS do analizy statystycznej i chemometrycznej

Etap przygotowania danych do analizy statystycznej i chemometrycznej jest niezwykle istotny w badaniach prowadzonych w strategii niecelowanej. Przede wszystkim powinien doprowadzić do pozostawienia jedynie danych reprezentujących zmienność biologiczną i istotnych ze względu na różnicowanie analizowanych próbek, czyli wyeliminowanie indywiduów chemicznych (MF) mogących wpłynąć na zafałszowanie wyników końcowych analizy porównawczej. Przygotowanie danych uzyskanych w trakcie analizy niecelowanej obejmuje zazwyczaj:

- wyodrębnienie indywiduów chemicznych z chromatogramów całkowitego prądu jonowego (TIC) uzyskanych w trakcie analizy LC-MS ekstraktów lipidów,
- dopasowanie czasów retencji oraz wartości m/z indywiduów chemicznych pomiędzy analizowanymi próbkami,
- normalizację danych,
- filtrację danych, w tym usunięcie próbek odbiegających.

Wyodrębnienie indywiduów chemicznych z chromatogramów całkowitego prądu jonowego można przeprowadzić automatycznie, poprzez wykorzystanie różnych algorytmów zawartych w wielu oprogramowaniach dostępnych komercyjnie lub za darmo (np. algorytm Molecular Feature Extraction w oprogramowaniu MassHunter Software, MZmine, XCMS).

Uzyskane indywidua chemiczne charakteryzują się czasem retencji, wartością m/z oraz objętością piku. Liczba indywiduów chemicznych wyodrębnionych z jednej próbki

zazwyczaj wynosi od kilkuset do tysiąca lub więcej, dlatego otrzymane dane muszą podlegać filtracji, w celu zachowania jedynie indywidualów chemicznych nie stanowiących szumu chemicznego (szumem chemicznym będą te indywiduala, które pochodzą od rozpuszczalników lub charakteryzują się dużą zmiennością, powyżej 30% względnego odchylenia standardowego powierzchni pików dla danej MF w próbkach QC). W tym celu dane następnie podlegają normalizacji i filtracji.

Normalizacja danych ma na celu wyeliminowanie zmienności wynikającej z różnic w objętości/masie analizowanych próbek (np. normalizacja na suchą masę, na objętość próbki) oraz zmienności technicznej (zmniejszenie lub zwiększenie intensywności sygnału w MS) wynikającej z ewentualnych niestabilności w działaniu systemu LC-MS (np. normalizacja na cały uzyskany sygnał MS, ang. *MS All Signal* lub na użyteczny sygnał MS (ang. *MS Total Useful Signal*). Filtracja natomiast ma na celu usunięcie MF, które nie spełniają wymaganych kryteriów, tj. częstości występowania w próbkach/w grupach próbek, dopuszczalnej wartości %RSD pola powierzchni pików, istotności statystycznej.

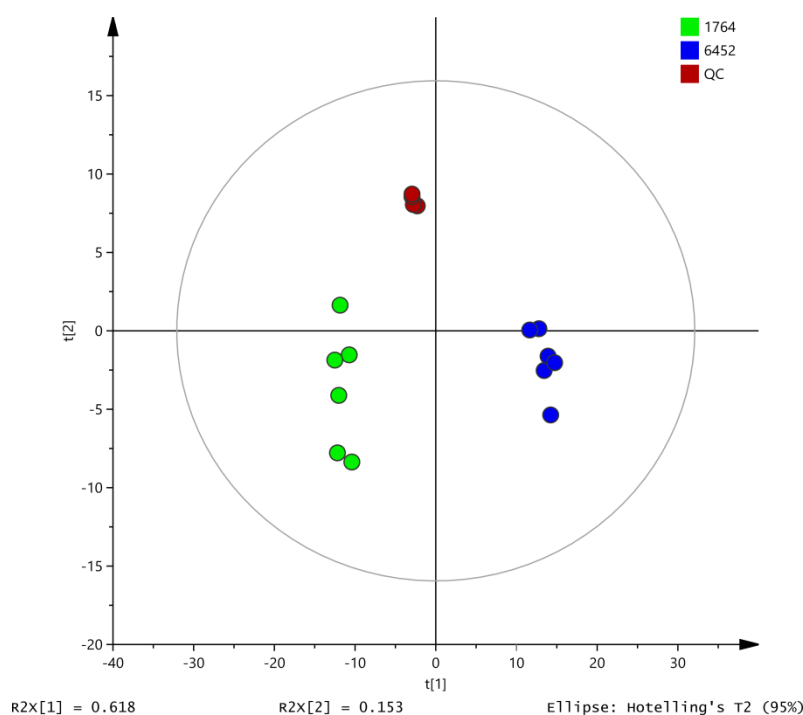
3.3.2 Walidacja analityczna metod analizy niecelowanej

Walidacja analityczna metody analizy niecelowanej jest wykonywana w celu określenia powtarzalności bądź odtwarzalności metody ekstrakcji oraz metody analizy LC-MS. Opracowanie metodyki o jak największej powtarzalności jest niezbędne ze względu na konieczność wskazania istotnych statystycznie różnic między próbkami, wynikających nie ze zmienności technicznej, ale rzeczywistej zmienności biologicznej. Im większa powtarzalność metody tym subtelniejsze różnice w składzie ilościowym lipidowym można wykazać. Powtarzalność metody analitycznej zazwyczaj określa się poprzez wyznaczenie %RSD objętości pików wyekstrahowanych indywidualów chemicznych ⁶¹:

- uzyskanych w wyniku powtórzonych trzykrotnie analiz LC-MS tego samego ekstraktu lipidów (powtarzalność metody LC-MS),
- uzyskanych w wyniku analiz LC-MS trzech różnych ekstraktów lipidów (powtarzalność ekstrakcyjna).

Uzyskane wartości %RSD objętości pików powinny być mniejsze niż w przypadku wartości %RSD wyznaczonych dla tych samych MF w przypadku niezależnego eksperymentu biologicznego (np. 3 ekstrakty uzyskane z 3 różnych hodowli bakteryjnych). Ponadto wartość %RSD objętości pików MF włączonych do analizy porównawczej nie powinna przekraczać 30%.

Niezwyczajnie cenna jest wizualizacja uzyskanych danych za pomocą metody głównych składowych (PCA). Technika PCA, poprzez rozmieszczenie punktów reprezentujących lipidowe odciski palca otrzymane podczas analizy próbek QC na wykresie rzutu przypadków na płaszczyznę dwóch pierwszych składowych umożliwia ocenę zmienności technicznej tj. sprawdzenie stabilności sygnału LC-MS podczas analizy próbek, powtarzalności przeprowadzonej ekstrakcji, a ponadto na wskazanie próbek odbiegających. Punkty reprezentujące lipidowe odciski palca uzyskane w trakcie analizy próbek QC powinny być skupione wokół jednego punktu, co świadczy o stabilności systemu LC-MS (Rysunek 6). Ponadto, powinny one znajdować się pomiędzy skupiskami punktów reprezentujących lipidowe odciski palca próbek rzeczywistych, jako że próbka QC zawiera taką samą objętość każdej z badanych próbek.



Rysunek 6. Wykres rzutu przypadków na płaszczyznę dwóch pierwszych składowych uzyskany w wyniku analizy PCA 4 próbek QC oraz 12 próbek rzeczywistych należących do dwóch grup.

3.3.3 Analiza statystyczna i chemometryczna oraz względna analiza ilościowa w lipidomice niecelowanej

Lipidomiczna analiza niecelowana pozwala na uzyskanie tzw. lipidowych odcisków palca. Ich porównanie z wykorzystaniem technik statystycznych i chemometrycznych umożliwia wskazanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi próbkami/grupami

próbek wraz z określeniem różnicy w poziomie zawartości. Względna analiza ilościowa, polegająca na porównaniu objętości/pól powierzchni wyodrębnionych indywidualów chemicznych pozwala na określenie krotności zmiany w zawartości danego lipidu pomiędzy badanymi próbkami – jest to tzw. względna analiza ilościowa, bardzo często stosowana w porównawczych badaniach lipidomicznych opartych na strategii analizy niecelowanej^{110–113}.

W celu porównania lipidowych odcisków palca ekstraktów lipidów oraz wskazania statystycznie istotnych różnic w zawartości lipidów pomiędzy próbkami stosowane są jednowymiarowe oraz wielowymiarowe metody analizy danych. Do metod jednowymiarowej analizy danych, używanych podczas obróbki danych uzyskanych w analizie niecelowanej należą test t-studenta, test U Manna-Whitneya i ANOVA. Celem przeprowadzenia tych testów jest wykazanie czy różnica w zawartości lipidów pomiędzy dwoma badanymi grupami próbek jest istotna statystycznie. O ile w metodach analizy jednowymiarowej każda zmienna rozpatrywana jest osobno, to w metodach analizy wielowymiarowej, wiele zmiennych branych jest pod uwagę jednocześnie. Wśród metod wielowymiarowej analizy danych stosowanych w lipidomice najpopularniejsze są: analiza głównych składowych (PCA), analiza dyskryminacyjna – cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS-DA) i jej odmiany, analiza hierarchiczna (HCA). Wymienione metody różnią się algorytmem działania oraz zastosowaniem, np. użycie metody z tzw. nauczycielem (PLS-DA, OPLS-DA) pozwala na poszukiwanie źródeł różnic pomiędzy badanymi grupami wśród wielu zmiennych, a zastosowanie metody bez nauczyciela takie jak PCA czy HCA umożliwia badanie relacji pomiędzy próbkami i zmiennymi (cechy próbek).

Wskazanie lipidów różnicujących badane próbki oraz określenie krotności zmiany w zawartości lipidu pozwala na wyodrębnienie wstępnej hipotezy badawczej, która zazwyczaj stanowi podstawę do dalszych badań, uwzględniających przede wszystkim bezwzględną analizę ilościową lipidów różnicujących.



CEL I ZAKRES PRACY

4 Cel i zakres pracy

Głównym założeniem rozprawy doktorskiej jest wykorzystanie lipidomiki do określenia różnic fenotypowych pomiędzy szczepami gronkowca złocistego, w kontekście występowania zjawiska antybiotykooporności i stosowania alternatywnych metod leczenia infekcji wywoływanych przez tę bakterię (terapia fotodynamiczna). W celu określenia różnic jakościowych oraz ilościowych lipidów komórkowych pomiędzy szczepami gronkowca złocistego porównane zostaną lipidowe odciski palca uzyskane w wyniku przeprowadzenia analiz lipidomicznych ekstraktów lipidów z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (LC-Q-TOF-MS) oraz zaawansowanych technik chemometrycznych.

Realizacja głównego założenia pracy doktorskiej obejmuje następujące cele cząstkowe:

- opracowanie i walidacja metodologii analitycznej umożliwiającej przeprowadzenie analizy lipidomicznej ekstraktów lipidów uzyskanych z komórek gronkowca złocistego; ta część badań obejmuje następujące etapy analityczne: lizę komórek bakteryjnych, ekstrakcję lipidów z lizatu bakteryjnego, analizę LC-Q-TOF-MS ekstraktu lipidów w trybie SCAN, wyodrębnienie indywiduów chemicznych z danych LC-MS, przygotowanie danych do analizy chemometrycznej, analizę statystyczną i chemometryczną, identyfikację lipidów różnicujących szczepy *S. aureus*,
- porównawcza analiza lipidomiczna dwóch szczepów *S. aureus* różniących się na poziomie jednego, znanego genu niezwiązanego z metabolizmem lipidów oraz o różnej wrażliwości na terapię fotodynamiczną (szczep referencyjny *S. aureus* Newman oraz szczep *S. aureus* z mutacją genu *HrtA*, charakteryzujący się większą wrażliwością na terapię fotodynamiczną),
- porównawcze analizy lipidomiczne szczepów gronkowca złocistego charakteryzujących się zróżnicowanym stopniem wrażliwości na wybrane antybiotyki (metycylina, gentamycyna, erytromycyna, kwas fusydowy, ciprofloksacyna) z wykorzystaniem opracowanej metodologii analitycznej, w tym identyfikację lipidów różniących się zawartością pomiędzy badanymi szczepami *S. aureus*, o potencjalnym znaczeniu dla występowania zjawiska oporności na antybiotyki.



CZĘŚĆ
DOŚWIADCZALNA

5 Część doświadczalna

5.1 Opracowanie metodologii oznaczania lipidów komórkowych gronkowca złocistego

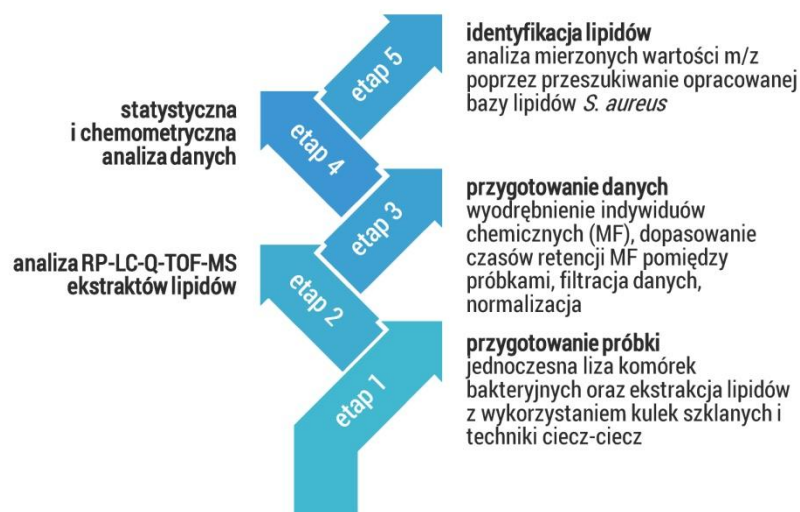
Przez wiele lat, metody analizy lipidów gronkowca złocistego ograniczały się do zastosowania techniki TLC i GC, które pozwalały jedynie na oznaczenie klasy lipidowej oraz zawartości kwasów tłuszczowych uzyskanych poprzez hydrolizę lipidów. Metody te uniemożliwiały uzyskanie informacji na temat różnic lipidomicznych w obrębie danej klasy lipidów.

Wskazanie różnic w składzie jakościowym oraz ilościowym lipidów pomiędzy szczepami gronkowca złocistego o zróżnicowanym fenotypie wymagało opracowania metodologii analitycznej umożliwiającej ekstrakcję, wykrycie oraz oznaczenie ilościowe jak największej liczby lipidów komórkowych obecnych w ekstrakcie w trakcie jednego cyklu analitycznego.

Ze względu na zróżnicowanie strukturalne i fizykochemiczne oznaczanych substancji oraz materiał biologiczny w postaci hodowli bakteryjnej, opracowanie całościowej metodologii analitycznej uwzględniającej wszystkie etapy badania lipidomicznego okazało się dużym wyzwaniem analitycznym. Rozwój metody wymagał nie tylko doboru odpowiednich warunków przygotowania próbki oraz warunków rozdzielania i detekcji lipidów w uzyskanych ekstraktach, ale również opracowania strategii przygotowania danych do analizy statystycznej i chemometrycznej. Do identyfikacji lipidów różnicujących szczepy *S. aureus*, konieczne stało się stworzenie bazy lipidów, zawierającej wszystkie lipidy teoretycznie mogące występować w komórkach tej bakterii. Opracowana metodologia analizy jakościowej lipidomu gronkowca złocistego i niecelowanej analizy porównawczej szczepów gronkowca złocistego przedstawiona jest schematycznie na Rysunku 7. Utworzona baza danych gronkowca złocistego pozwala na identyfikację lipidów tej bakterii do poziomu tzw. grupy lipidowej, określającej łączną sumę atomów węgla oraz liczby wiązań podwójnych w łańcuchach bocznych lipidów. Opracowana baza lipidów zawiera 7047 grupy lipidowe, należących do 18 klas i 36 podklas (według nomenklatury *LipidMaps*, <http://lipidmaps.org>). Termin grupa lipidowa odnosi się do lipidów o tej samej liczbie atomów węgla oraz liczbie wiązań podwójnych w podstawnikach acylowych ¹¹¹. Ponadto na podstawie

przeprowadzonych analiz MS/MS możliwe stało się potwierdzenie tożsamości 66 grup lipidowych obecnych w ekstraktach lipidowych *S. aureus*.

Walidację metodologii przeprowadzono zgodnie z wymogami określonymi dla metod analiz niecelowanych: określono powtarzalność etapu przygotowania próbki oraz powtarzalność analizy LC-Q-TOF-MS. Opracowana metodologia wraz ze stworzoną bazą lipidów są pierwszym narzędziem analitycznym umożliwiającym jednoczesne oznaczenie większości lipidów gronkowca złocistego w trakcie jednego cyklu analitycznego oraz szybką analizę porównawczą szczepów tej bakterii ze wskazaniem oraz identyfikacją lipidów różnicujących analizowane szczepy.



Rysunek 7. Schemat przedstawiający etapy opracowanej metodologii analitycznej umożliwiającej analizę jakościową lipidom gronkowca złocistego i niecelowaną analizę porównawczą szczepów gronkowca złocistego.

Użyteczność opracowanej metodologii do porównawczych badań lipidomicznych wykazano poprzez przeprowadzenie analizy porównawczej dwóch referencyjnych szczepów różniących się stopniem wrażliwości na antybiotyki: *S. aureus* COL (szczep odporny na metycylinę, MRSA) oraz *S. aureus* Newman (szczep wrażliwy na metycylinę, MSSA). Wykonane analizy wykazały różnice w składzie ilościowym lipidomów obu szczepów. Dzięki wykorzystaniu metodologii zidentyfikowano oraz określono różnice w zawartości lipidów różnicujących oba szczepy.

Wyniki dotyczące opracowania oraz walidacji metodologii wykrywania oraz oznaczania lipidów gronkowca złocistego, tworzenia bazy lipidów *S. aureus* oraz analizy porównawczej dwóch szczepów referencyjnych zostały opublikowane w czasopiśmie *Journal*

of Chromatography A (IF=4,150) w artykule pt. „Comprehensive methodology for *Staphylococcus aureus* lipidomics by liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry”¹¹⁴ (**Załącznik 1**). Baza lipidów jest dostępna *on-line* jako materiały dodatkowe załączone do opublikowanego artykułu.

Wnioski. Opracowana metodologia analityczna umożliwia analizę lipidów gronkowca złocistego, dzięki czemu możliwe jest poznanie składu lipidowego komórek tej bakterii oraz określenie różnic lipidomicznych pomiędzy szczepami o zróżnicowanym fenotypie. Zaproponowana procedura obejmująca przygotowanie próbki, rozdzielanie lipidów oraz ich wykrycie z wykorzystaniem techniki LC-Q-TOF-MS znacznie przyspiesza i ułatwia analizę ekstraktów lipidowych w porównaniu do powszechnie stosowanych w badaniach lipidów technik GC i TLC. Ponadto, zastosowanie wysokorozdzielczego spektrometru mas typu Q-TOF oraz stworzonej bazy lipidów *S. aureus* umożliwia identyfikację oraz zaproponowanie struktur głównych lipidów komórkowych tej bakterii: fosfatydylogliceroli, diacylogliceroli, kardiolipin, diglikozylodiacylogliceroli, monoglikozylodiacylogliceroli oraz lizylfosfatydylogliceroli. Zastosowanie techniki MS/MS umożliwia również określenie długości podstawników acylowych w wykrytych lipidach. Duża moc dyskryminacyjna opracowanej metody LC-MS umożliwia również rozdzielanie oraz oznaczenie izomerów lipidów, co nie jest możliwe przy stosowaniu innych metod analizy lipidów *S. aureus*. Ponadto duża powtarzalność przedstawionej metody pozwala na oznaczenie lipidów z wysoką precyzją, co pozwala na wykazanie subtelnych różnic biologicznych pomiędzy badanymi komórkami gronkowca złocistego. Dzięki połączeniu techniki LC-Q-TOF-MS z biostatystyczną i chemometryczną analizą danych, opracowana metodologia może być z powodzeniem zastosowana do badań lipidomicznych o różnym kontekście biologicznym.

5.2 Określenie różnic lipidomicznych pomiędzy szczepami *S. aureus* o znanej różnicy genotypowej poprzez porównanie lipidowych odcisków palca uzyskanych z wykorzystaniem techniki LC-Q-TOF-MS

Głównym założeniem tej części pracy doktorskiej było wskazanie różnic lipidomicznych pomiędzy szczepami gronkowca złocistego różniącymi się obecnością lub brakiem znanych genów, nie powiązanych bezpośrednio z metabolizmem lipidów komórkowych tej bakterii.

Przeprowadzono analizy LC-Q-TOF-MS dwóch szczepów gronkowca złocistego: (i) szczepu referencyjnego *S. aureus* Newman oraz (ii) szczepu *S. aureus* Newman HrtA z delecją genu kodującego błonowe białko odpowiedzialne za transport hemu. Porównanie uzyskanych lipidowych odcisków palca pozwoliło na wskazanie i zidentyfikowanie lipidów różnicujących oba szczepy. Co ciekawe, pomimo iż, inaktywowany gen *hrtA* nie jest związany bezpośrednio z metabolizmem lipidów, brak kodowanego przez nie białka jest powiązany ze zmianami w składzie lipidów komórkowych. W komórkach szczepu *S. aureus* Newman HrtA zaobserwowano statystycznie istotną podwyższoną zawartość diacylogliceroli i obniżoną zawartość lizylofosfatydylogliceroli w porównaniu ze szczepem Newman. W przypadku DGDG oraz MGDG nie zaobserwowano jednoznacznego wzrostu bądź spadku zawartości dla wszystkich grup lipidowych u obu szczepów. Co więcej, szczepy różniły się zawartością wybranych izomerów DGDG i MGDG. W celu wskazania różnic w długości kwasów tłuszczowych obecnych w cząsteczkach MGDG i DGDG, przeprowadzono analizę LC-MS/MS próbek ekstraktów lipidów. Porównanie uzyskanych widm MS/MS dla różnych izomerów grup lipidowych o takiej samej masie monoizotopowej wykazało brak różnic w liczbie atomów węgla w resztach kwasów tłuszczowych obecnych w strukturze tych izomerów. Taka obserwacja sugeruje inny rodzaj izomerii, np. różnicę w strukturze reszt kwasów tłuszczowych, polegająca na obecności lub braku rozgałęzień typu *iso*- i *anteiso*-).

Przeprowadzone analizy są częścią badań dotyczących określenia mechanizmu wrażliwości komórek gronkowca złocistego na terapię fotodynamiczną, prowadzonych w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed przez Dr Joannę Nakonieczną. Uzyskane wyniki wskazały na fizyczne właściwości błony komórkowej (płynność błony) jako element warunkujący odpowiedź gronkowca złocistego na fotoinaktywację. Wyniki opublikowano w czasopiśmie *Applied Microbiology and*

Biotechnology (IF=3,882) w artykule pt. „*Photoinactivation of Staphylococcus aureus using protoporphyrin IX: the role of haem-regulated transporter HrtA*”¹¹⁵ **(Załącznik 2)**.

Wnioski. Opracowaną metodologię analityczną umożliwiającą oznaczanie lipidów gronkowca złocistego wykorzystano do analizy lipidomicznej szczepów tej bakterii różniących się na poziomie jednego, znanego genu. Duża precyzja zastosowanej metody pozwoliła na wskazanie istotnych statystycznie różnic lipidomicznych pomiędzy oba szczepami, nawet na poziomie 0,2-krotnej różnicy w zawartości danego lipidu. Wysoka rozdzielczość metody, umożliwiająca rozdzielenie izomerów pozwoliła na wykazanie różnic w zawartości izomerów należących do klas MGDG i DGDG pomiędzy szczepem *S. aureus* Newman HrtA i szczepem *S. aureus* Newman. Mimo, że unieczynniony gen w szczepie *S. aureus* Newman HrtA nie jest związany z metabolizmem lipidów, można zaobserwować różnice fenotypowe na poziomie lipidomu pomiędzy szczepem zawierającym unieczynniony gen a szczepem z aktywnym genem.

5.3 Porównanie lipidowych odcisków palca szczepów *S. aureus* o zróżnicowanej wrażliwości na antybiotyki z wykorzystaniem techniki LC-Q-TOF-MS

Jedną z cech fenotypowych gronkowca złocistego jest stopień wrażliwości na różnego rodzaju antybiotyki. Pomiedzy komórkami szczepów *S. aureus* opornymi a wrażliwymi na antybiotyki (takie jak metycylina, daptomycyna, kwas fusydowy czy gentamycyna) wykazano różnice w składzie lipidów błonowych¹⁰⁻¹⁴. Jednak rola lipidów w występowaniu oporności na antybiotyki u szczepów tej bakterii wciąż jest niejasna.

W celu wskazania różnic pomiędzy szczepami gronkowca złocistego na poziomie metabolizmu lipidów przeprowadzono analizę porównawczą próbek ekstraktów lipidów czternastu izolatów klinicznych gronkowca złocistego o zróżnicowanej wrażliwości na pięć wybranych antybiotyków: metycylinę, gentamycynę, ciprofloksacynę, erytromycynę i kwas fusydowy. Analizie LC-Q-TOF-MS poddano próbki ekstraktów lipidów pochodzących od 7 szczepów MRSA oraz 7 szczepów MSSA wykorzystując opracowaną wcześniej metodologię i otrzymując 84 lipidowe odciski palca. W celu określenia zależności pomiędzy składem lipidów komórkowych a opornością na wybrane antybiotyki dokonano porównania uzyskanych lipidowych odcisków palca poprzez zastosowanie analizy statystycznej (test Mann-Whitney'a) oraz analizy chemometrycznej (OPLS-DA). Przeprowadzona analiza biostatystyczna i chemometryczna doprowadziła do wskazania istotnych statystycznie lipidów różnicujących izolaty kliniczne *S. aureus* odporne i wrażliwe na badane antybiotyki. Co więcej, powiązано zaobserwowane różnice lipidomiczne ze szlakami biosyntezy lipidów i ich pochodnych.

Wyniki badań opublikowano w czasopiśmie *Journal of Proteome Research* (IF=4,341) w artykule pt. „*Untargeted Lipidomics Reveals Differences in the Lipid Pattern among Clinical Isolates of Staphylococcus aureus Resistant and Sensitive to Antibiotics*”¹¹⁶ (Załącznik 3).

Wnioski. Porównanie lipidowych odcisków palca szczepów *S. aureus* wrażliwych oraz opornych na antybiotyki wykazało korelację różnic w zawartości lipidów pomiędzy szczepami z występowaniem oporności na antybiotyki. Po raz pierwszy wskazano różnice lipidomiczne pomiędzy tak dużą liczbą izolatów klinicznych (n=14) *S. aureus*, charakteryzujących się zróżnicowaną wrażliwością na aż pięć antybiotyków jednocześnie oraz do poziomu grupy lipidowej, z uwzględnieniem izomerów lipidów. Co ciekawe, przypadku większości badanych

antybiotyków oporność powiązana była z trendami zmian w zawartości tych samych klas lipidów, przede wszystkim ze zwiększoną zawartością MGDG, PG i DGDG oraz ze zmniejszoną zawartością DG.

Ponadto zaobserwowano dużą zmienność w składzie ilościowym lipidów w obrębie jednej grupy szczepów, tj. szczepów opornych lub wrażliwych, a nawet w obrębie tego samego szczepu bakteryjnego, co wskazuje na dużą zmienność fenotypową komórek bakteryjnych oraz na konieczność analizy ekstraktów lipidów pochodzących od wielu szczepów, hodowanych w kilku powtórzeniach w celu wyekstrahowania informacji na temat różnic lipidomicznych między szczepami bakteryjnymi.

Zaobserwowane różnice w zawartości lipidów mogą odzwierciedlać różnice w metabolizmie lipidów oraz w strukturze błony pomiędzy badanymi szczepami *S. aureus* wrażliwymi i opornymi na antybiotyki. Uzyskane wyniki wskazują, że skład lipidowy błony komórkowej oraz jej fizyczne właściwości mogą być związane z występowaniem oporności na antybiotyki i powinno być przedmiotem dalszych badań na temat roli lipidów w występowaniu tego zjawiska.



WNIOSKI KOŃCOWE

6 Wnioski końcowe

W niniejszej rozprawie doktorskiej wykorzystano techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (LC-Q-TOF-MS) do analizy lipidomicznej komórek szczepów gronkowca złocistego. Niecelowaną lipidomikę zastosowano w celu określenia różnic fenotypowych pomiędzy szczepami gronkowca złocistego, w kontekście występowania zjawiska antybiotykooporności i stosowania alternatywnych metod leczenia infekcji wywołanych przez tą bakterię (terapia fotodynamiczna). Wykazanie różnic jakościowych oraz ilościowych lipidów komórkowych pomiędzy szczepami gronkowca złocistego dokonano poprzez porównanie lipidowych odcisków palca uzyskanych podczas analizy lipidomicznej ekstraktów lipidów z wykorzystaniem techniki LC-Q-TOF-MS.

Główne założenia pracy doktorskiej zrealizowano poprzez następujące cele częściowe:

- opracowanie i walidację metodologii analitycznej umożliwiającej przeprowadzenie analizy lipidomicznej ekstraktów lipidów uzyskanych z komórek gronkowca złocistego; ta część badań obejmowała następujące etapy analityczne: lizę komórek bakteryjnych, ekstrakcję lipidów z lizatu bakteryjnego, analizę LC-Q-TOF-MS ekstraktu lipidów w trybie SCAN, wyodrębnienie indywiduów chemicznych z danych LC-MS, przygotowanie danych do analizy chemometrycznej, analizę statystyczną i chemometryczną, identyfikację lipidów różnicujących szczepy *S. aureus*,
- porównawczą analizę lipidomiczną dwóch szczepów *S. aureus* różniących się na poziomie jednego, znanego genu niezwiązanego z metabolizmem lipidów oraz o różnej wrażliwości na terapię fotodynamiczną (szczep referencyjny Newman oraz szczep *S. aureus* z mutacją genu HrtA, charakteryzujący się większą wrażliwością na terapię fotodynamiczną),
- porównawczą analizę lipidomiczną szczepów gronkowca złocistego charakteryzujących się zróżnicowanym stopniem wrażliwości na wybrane antybiotyki (metycyлина, gentamycyna, erytromycyna, kwas fusydowy, ciprofloksacyna) z wykorzystaniem opracowanej metodologii analitycznej, a także identyfikację lipidów różniących się zawartością pomiędzy badanymi szczepami *S. aureus*, o potencjalnym znaczeniu dla występowania zjawiska oporności na antybiotyki.



LITERATURA

7 Literatura

- (1) Gordon, R. J.; Lowy, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46 Suppl 5*, S350–S359.
- (2) Howden, B. P.; McEvoy, C. R. E.; Allen, D. L.; Chua, K.; Gao, W.; Harrison, P. F.; Bell, J.; Coombs, G.; Bennett-Wood, V.; Porter, J. L.; Robins-Browne, R.; Davies, J. K.; Seemann, T.; Stinear, T. P. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalkR. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002359.
- (3) Drew, R. H. Emerging options for treatment of invasive, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Pharmacotherapy* **2007**, *27*, 227–249.
- (4) Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- (5) Chambers, H. F.; Deleo, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 629–641.
- (6) Liu, G. Y. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr. Res.* **2009**, *65*, 71R – 77R.
- (7) Becher, D.; Hempel, K.; Sievers, S.; Zühlke, D.; Pané-Farré, J.; Otto, A.; Fuchs, S.; Albrecht, D.; Bernhardt, J.; Engelmann, S.; Völker, U.; van Dijl, J. M.; Hecker, M. A proteomic view of an important human pathogen - towards the quantification of the entire *Staphylococcus aureus* proteome *PLoS One* **2009**, *4*, e8176.
- (8) Liebeke, M.; Dörries, K.; Zühlke, D.; Bernhardt, J.; Fuchs, S.; Pané-Farré, J.; Engelmann, S.; Völker, U.; Bode, R.; Dandekar, T.; Lindequist, U.; Hecker, M.; Lalk, M. A metabolomics and proteomics study of the adaptation of *Staphylococcus aureus* to glucose starvation *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 1241–1253.
- (9) Cordwell, S. J.; Larsen, M. R.; Cole, R. T.; Walsh, B. J. Comparative proteomics of *Staphylococcus aureus* and the response of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains to Triton X-100 *Microbiology* **2002**, *148*, 2765–2781.
- (10) Mishra, N. N.; Bayer, A. S.; Weidenmaier, C.; Grau, T.; Wanner, S.; Stefani, S.; Cafiso, V.; Bertuccio, T.; Yeaman, M. R.; Nast, C. C.; Yang, S.-J. Phenotypic and genotypic characterization of daptomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: relative roles of *mprF* and *dlt* operons. *PLoS One* **2014**, *9*, e107426.

- (11) Mishra, N. N.; Bayer, A. S. Correlation of cell membrane lipid profiles with daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 1082–1085.
- (12) Nishi, H.; Komatsuzawa, H.; Fujiwara, T.; McCallum, N.; Sugai, M. Reduced content of lysyl-phosphatidylglycerol in the cytoplasmic membrane affects susceptibility to moenomycin, as well as vancomycin, gentamicin, and antimicrobial peptides, in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4800–4807.
- (13) Pisano, M. a.; Ball, D. J.; Eriquez, L. Temperature-related variations in the lipid composition of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains *J. Clin. Microbiol.* **1983**, *17*, 1170–1172.
- (14) Chopra, I. Mechanisms of resistance to fusidic acid in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **1976**, *96*, 229–238.
- (15) Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R. H.; 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*, 839–861.
- (16) 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 Suppl*, S9–S14.
- (17) Fahy, E.; Cotter, D.; Sud, M.; Subramaniam, S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1811*, 637–647.
- (18) Han, X.; Gross, R. W. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 367–412.
- (19) Overgaard, A. J.; Weir, J. M.; De Souza, D. P.; Tull, D.; Haase, C.; Meikle, P. J.; Pociot, F. Lipidomic and metabolomic characterization of a genetically modified mouse model of the early stages of human type 1 diabetes pathogenesis. *Metabolomics* **12**, 13.
- (20) Pietiläinen, K. H.; Róg, T.; Seppänen-Laakso, T.; Virtue, S.; Gopalacharyulu, P.; Tang, J.; Rodriguez-Cuenca, S.; Maciejewski, A.; Naukkarinen, J.; Ruskeepää, A.-L.; Niemelä, P. S.; Yetukuri, L.; Tan, C. Y.; Velagapudi, V.; Castillo, S.; Nygren, H.; Hyötyläinen, T.; Rissanen, A.; Kaprio, J.; Yki-Järvinen, H.; Vattulainen, I.; Vidal-Puig, A.; Orešič, M. Association of lipidome remodeling in the adipocyte membrane with acquired obesity

- in humans. *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1000623.
- (21) Ekroos, K.; Jänis, M.; Tarasov, K.; Hurme, R.; Laaksonen, R. Lipidomics: a tool for studies of atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2010**, *12*, 273–281.
- (22) Naudí, A.; Cabré, R.; Jové, M.; Ayala, V.; Gonzalo, H.; Portero-Otín, M.; Ferrer, I.; Pamplona, R. Lipidomics of human brain aging and Alzheimer's disease pathology. *Int. Rev. Neurobiol.* **2015**, *122*, 133–189.
- (23) Lattif, A. A.; Mukherjee, P. K.; Chandra, J.; Roth, M. R.; Welti, R.; Rouabhia, M.; Ghannoum, M. A. Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation *Microbiology* **2011**, *157*, 3232–3242.
- (24) Singh, A.; Mahto, K. K.; Prasad, R. Lipidomics and in vitro azole resistance in *Candida albicans*. *OMICS* **2013**, *17*, 84–93.
- (25) Joyce, G. H.; Hammond, R. K.; White, D. C. Changes in membrane lipid composition in exponentially growing *Staphylococcus aureus* during the shift from 37 to 25 C *J. Bacteriol.* **1970**, *104*, 323–330.
- (26) Alves, E.; Melo, T.; Simões, C.; Faustino, M. a F.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. a S.; Cunha, A.; Gomes, N. C. M.; Domingues, P.; Domingues, M. R. M.; Almeida, A. Photodynamic oxidation of *Staphylococcus warneri* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 1607–1618.
- (27) Lindberg, L.; Santos, A. X.; Riezman, H.; Olsson, L.; Bettiga, M. Lipidomic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* reveals critical changes in lipid composition in response to acetic acid stress. *PLoS One* **2013**, *8*, e73936.
- (28) White, D. C.; Frerman, F. E. Extraction, Characterization, and Cellular Localization of the Lipids of *Staphylococcus aureus* *J. Bacteriol.* **1967**, *94*, 1854–1867.
- (29) Fischer, W. Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus* *Med. Microbiol. Immunol.* **1994**, *183*, 61–76.
- (30) Short, S. A.; White, D. C. Metabolism of phosphatidylglycerol, lysylphosphatidylglycerol, and cardiolipin of *Staphylococcus aureus* *J. Bacteriol.* **1971**, *108*, 219–226.
- (31) Short, S. A.; White, D. C. Metabolism of the Glucosyl Diglycerides and Phosphatidylglucose of *Staphylococcus aureus* *J Bacteriol* **1970**, *104*, 126–132.

- (32) Zhang, Y.-M.; Rock, C. O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 222–233.
- (33) Fernández, L.; Hancock, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, *25*, 661–681.
- (34) Vikström, S.; Li, L.; Wieslander, A. The nonbilayer/bilayer lipid balance in membranes. Regulatory enzyme in *Acholeplasma laidlawii* is stimulated by metabolic phosphates, activator phospholipids, and double-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9296–9302.
- (35) Fischer, W. Mini review Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus* **1994**, 61–76.
- (36) Schneewind, O.; Missiakas, D. Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **2014**, *196*, 1133–1142.
- (37) Parsons, J. B.; Frank, M. W.; Jackson, P.; Subramanian, C.; Rock, C. O. branched *Mol. Microbiol.* **2014**, *92*, 234–245.
- (38) Singh, V. K.; Hattangady, D. S.; Giotis, E. S.; Singh, A. K.; Chamberlain, N. R.; Stuart, M. K.; Wilkinson, B. J. Insertional inactivation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* leads to decreased branched-chain membrane fatty acid content and increased susceptibility to certain stresses *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 5882–5890.
- (39) Han, X.; Gross, R. W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 1071–1079.
- (40) FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
- (41) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917.
- (42) Chen, S.; Hoene, M.; Li, J.; Li, Y.; Zhao, X.; Häring, H.-U.; Schleicher, E. D.; Weigert, C.; Xu, G.; Lehmann, R. Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl tert-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1298*, 9–16.
- (43) Löfgren, L.; Ståhlman, M.; Forsberg, G.-B.; Saarinen, S.; Nilsson, R.; Hansson, G. I. The BUMÉ method: a novel automated chloroform-free 96-well total lipid extraction

- method for blood plasma. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1690–1700.
- (44) Hara, A.; Radin, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* **1978**, *90*, 420–426.
- (45) Hauff, S.; Vetter, W. Quantification of fatty acids as methyl esters and phospholipids in cheese samples after separation of triacylglycerides and phospholipids. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *636*, 229–235.
- (46) Tsikas, D.; Zoerner, A.; Mitschke, A.; Homsy, Y.; Gutzki, F.-M.; Jordan, J. Specific GC-MS/MS stable-isotope dilution methodology for free 9- and 10-nitro-oleic acid in human plasma challenges previous LC-MS/MS reports. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 2895–2908.
- (47) Horák, T.; Culík, J.; Cejka, P.; Jurková, M.; Kellner, V.; Dvorák, J.; Hasková, D. Analysis of free fatty acids in beer: comparison of solid-phase extraction, solid-phase microextraction, and stir bar sorptive extraction. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11081–11085.
- (48) Orozco-Solano, M.; Ruiz-Jiménez, J.; Luque de Castro, M. D. Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 1227–1235.
- (49) Pusvaskiene, E.; Januskevicius, B.; Prichodko, A.; Vickackaite, V. Simultaneous Derivatization and Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for Fatty Acid GC Determination in Water *Chromatographia* **2008**, *69*, 271–276.
- (50) 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 *TrAC Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 393–403.
- (51) Yan, X.; Xu, J.; Chen, J.; Chen, D.; Xu, S.; Luo, Q.; Wang, Y. Lipidomics focusing on serum polar lipids reveals species dependent stress resistance of fish under tropical storm *Metabolomics* **2011**, *8*, 299–309.
- (52) Wang, C.; Kong, H.; Guan, Y.; Yang, J.; Gu, J.; Yang, S.; Xu, G. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4108–4116.
- (53) Jones, J. J.; Borgmann, S.; Wilkins, C. L.; O'Brien, R. M. Characterizing the phospholipid

- profiles in mammalian tissues by MALDI FTMS. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3062–3071.
- (54) Shaner, R. L.; Allegood, J. C.; Park, H.; Wang, E.; Kelly, S.; Haynes, C. A.; Sullards, M. C.; Merrill, A. H. Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 1692–1707.
- (55) Song, J.; Liu, X.; Wu, J.; Meehan, M. J.; Blevitt, J. M.; Dorrestein, P. C.; Milla, M. E. A highly efficient, high-throughput lipidomics platform for the quantitative detection of eicosanoids in human whole blood. *Anal. Biochem.* **2013**, *433*, 181–188.
- (56) Ekroos, K.; Chernushevich, I. V.; Simons, K.; Shevchenko, A. Quantitative profiling of phospholipids by multiple precursor ion scanning on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 941–949.
- (57) Taguchi, R.; Houjou, T.; Nakanishi, H.; Yamazaki, T.; Ishida, M.; Imagawa, M.; Shimizu, T. Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *823*, 26–36.
- (58) MacDougall, K. M.; McNichol, J.; McGinn, P. J.; O’Leary, S. J. B.; Melanson, J. E. Triacylglycerol profiling of microalgae strains for biofuel feedstock by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 2609–2616.
- (59) Sánchez, B. A.; Capote, F. P.; Luque de Castro, M. D. Targeted analysis of sphingoid precursors in human biofluids by solid-phase extraction with in situ derivatization prior to μ -LC-LIF determination. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 757–765.
- (60) Min, H. K.; Lim, S.; Chung, B. C.; Moon, M. H. Shotgun lipidomics for candidate biomarkers of urinary phospholipids in prostate cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 823–830.
- (61) Sandra, K.; Pereira, A. D. S.; Vanhoenacker, G.; David, F.; Sandra, P. Comprehensive blood plasma lipidomics by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 4087–4099.
- (62) Whiley, L.; Godzien, J.; Ruperez, F. J.; Legido-Quigley, C.; Barbas, C. In-vial dual extraction for direct LC-MS analysis of plasma for comprehensive and highly reproducible metabolic fingerprinting. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5992–5999.
- (63) Hutchins, P. M.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. Separation of cellular nonpolar neutral lipids by normal-phase chromatography and analysis by electrospray ionization mass

- spectrometry. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 804–813.
- (64) Nie, H.; Liu, R.; Yang, Y.; Bai, Y.; Guan, Y.; Qian, D.; Wang, T.; Liu, H. Lipid profiling of rat peritoneal surface layers by online normal- and reversed-phase 2D LC QToF-MS *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2833–2844.
- (65) Buré, C.; Aycirix, S.; Testet, E.; Schmitter, J.-M. A single run LC-MS/MS method for phospholipidomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 203–213.
- (66) Cífková, E.; Hájek, R.; Lísa, M.; Holčapek, M. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry of (lyso)phosphatidic acids, (lyso)phosphatidylserines and other lipid classes. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1439*, 65–73.
- (67) Draisma, H. H. M.; Reijmers, T. H.; Meulman, J. J.; van der Greef, J.; Hankemeier, T.; Boomsma, D. I. Hierarchical clustering analysis of blood plasma lipidomics profiles from mono- and dizygotic twin families. *Eur. J. Hum. Genet.* **2013**, *21*, 95–101.
- (68) Ishikawa, M.; Maekawa, K.; Saito, K.; Senoo, Y.; Urata, M.; Murayama, M.; Tajima, Y.; Kumagai, Y.; Saito, Y. Plasma and serum lipidomics of healthy white adults shows characteristic profiles by subjects' gender and age. *PLoS One* **2014**, *9*, e91806.
- (69) Martinez, T. N.; Chen, X.; Bandyopadhyay, S.; Merrill, A. H.; Tansey, M. G. Ceramide sphingolipid signaling mediates Tumor Necrosis Factor (TNF)-dependent toxicity via caspase signaling in dopaminergic neurons. *Mol. Neurodegener.* **2012**, *7*, 45.
- (70) Lee, S.-Y.; Kim, J. R.; Ha, M.-Y.; Shim, S.-M.; Park, T.-S. Measurements of diacylglycerols in skeletal muscle by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Lipids* **2013**, *48*, 287–296.
- (71) Giuffrida, F.; Cruz-Hernandez, C.; Flück, B.; Tavazzi, I.; Thakkar, S. K.; Destailats, F.; Braun, M. Quantification of phospholipids classes in human milk. *Lipids* **2013**, *48*, 1051–1058.
- (72) Rastegar, A.; Pelletier, A.; Duportail, G.; Freysz, L.; Leray, C. Sensitive analysis of phospholipid molecular species by high-performance liquid chromatography using fluorescent naproxen derivatives of diacylglycerols. *J. Chromatogr.* **1990**, *518*, 157–165.
- (73) Wwhiley, L.; Godzien, J.; Ruperez, F. J.; Legido-Quigley, C.; Barbas, C. In-vial dual extraction for direct LC-MS analysis of plasma for comprehensive and highly reproducible metabolic fingerprinting *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5992–5999.
- (74) Bui, H. H.; Leohr, J. K.; Kuo, M.-S. Analysis of sphingolipids in extracted human plasma

- using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2012**, *423*, 187–194.
- (75) t'Kindt, R.; Jorge, L.; Dumont, E.; Couturon, P.; David, F.; Sandra, P.; Sandra, K. Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 403–411.
- (76) Layre, E.; Sweet, L.; Hong, S.; Madigan, C. A.; Desjardins, D.; Young, D. C.; Cheng, T.-Y.; Annand, J. W.; Kim, K.; Shamputa, I. C.; McConnell, M. J.; Debono, C. A.; Behar, S. M.; Minnaard, A. J.; Murray, M.; Barry, C. E.; Matsunaga, I.; Moody, D. B. A comparative lipidomics platform for chemotaxonomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1537–1549.
- (77) Bobeldijk, I.; Hekman, M.; de Vries-van der Weij, J.; Coulier, L.; Ramaker, R.; Kleemann, R.; Kooistra, T.; Rubingh, C.; Freidig, A.; Verheij, E. Quantitative profiling of bile acids in biofluids and tissues based on accurate mass high resolution LC-FT-MS: compound class targeting in a metabolomics workflow. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *871*, 306–313.
- (78) Del Boccio, P.; Raimondo, F.; Pieragostino, D.; Morosi, L.; Cozzi, G.; Sacchetta, P.; Magni, F.; Pitto, M.; Urbani, A. A hyphenated microLC-Q-TOF-MS platform for exosomal lipidomics investigations: application to RCC urinary exosomes. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 689–696.
- (79) Surma, M. A.; Herzog, R.; Vasilj, A.; Klose, C.; Christinat, N.; Morin-Rivron, D.; Simons, K.; Masoodi, M.; Sampaio, J. L. An automated shotgun lipidomics platform for high throughput, comprehensive, and quantitative analysis of blood plasma intact lipids *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, *117*, 1540–1549.
- (80) Sampaio, J. L.; Gerl, M. J.; Klose, C.; Ejsing, C. S.; Beug, H.; Simons, K.; Shevchenko, A. Membrane lipidome of an epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 1903–1907.
- (81) Angelini, R.; Babudri, F.; Lobasso, S.; Corcelli, A. MALDI-TOF/MS analysis of archaeobacterial lipids in lyophilized membranes dry-mixed with 9-aminoacridine. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2818–2825.
- (82) Angelini, R.; Vitale, R.; Patil, V. A.; Cocco, T.; Ludwig, B.; Greenberg, M. L.; Corcelli, A. Lipidomics of intact mitochondria by MALDI-TOF/MS. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1417–1425.

- (83) Han, X.; Gross, R. W. Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of human erythrocyte plasma membrane phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 10635–10639.
- (84) Han, X.; Gross, R. W. Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2001**, *295*, 88–100.
- (85) Han, X.; Holtzman, D. M.; McKeel, D. W. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 1168–1180.
- (86) Cheng, H.; Sun, G.; Yang, K.; Gross, R. W.; Han, X. Selective desorption/ionization of sulfatides by MALDI-MS facilitated using 9-aminoacridine as matrix. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 1599–1609.
- (87) Fuchs, B. Analysis of phospholipids and glycolipids by thin-layer chromatography-matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 62–73.
- (88) Melo, T.; Videira, R. A.; André, S.; Maciel, E.; Francisco, C. S.; Oliveira-Campos, A. M.; Rodrigues, L. M.; Domingues, M. R. M.; Peixoto, F.; Manuel Oliveira, M. Tacrine and its analogues impair mitochondrial function and bioenergetics: a lipidomic analysis in rat brain. *J. Neurochem.* **2012**, *120*, 998–1013.
- (89) Paglia, G.; Ifa, D. R.; Wu, C.; Corso, G.; Cooks, R. G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry analysis of lipids after two-dimensional high-performance thin-layer chromatography partial separation. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1744–1750.
- (90) Lobasso, S.; Lopalco, P.; Angelini, R.; Vitale, R.; Huber, H.; Müller, V.; Corcelli, A. Coupled TLC and MALDI-TOF/MS analyses of the lipid extract of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Archaea* **2012**, *2012*, 957852.
- (91) Fuchs, B.; Schiller, J.; Süß, R.; Schürenberg, M.; Suckau, D. A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 827–834.
- (92) Ubhayasekera, S. J. K. A.; Staaf, J.; Forslund, A.; Bergsten, P.; Bergquist, J. Free fatty acid determination in plasma by GC-MS after conversion to Weinreb amides. *Anal.*

- Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 1929–1935.
- (93) Lin, Y. H.; Salem, N.; Wells, E. M.; Zhou, W.; Loewke, J. D.; Brown, J. A.; Lands, W. E. M.; Goldman, L. R.; Hibbeln, J. R. Automated high-throughput fatty acid analysis of umbilical cord serum and application to an epidemiological study. *Lipids* **2012**, *47*, 527–539.
- (94) Tranchida, P. Q.; Franchina, F. A.; Dugo, P.; Mondello, L. A flow-modulated comprehensive gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of fatty acid profiles in marine and biological samples. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1255*, 171–176.
- (95) Axelsen, P. H.; Murphy, R. C. Quantitative analysis of phospholipids containing arachidonate and docosahexaenoate chains in microdissected regions of mouse brain. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 660–671.
- (96) Krone, N.; Hughes, B. A.; Lavery, G. G.; Stewart, P. M.; Arlt, W.; Shackleton, C. H. L. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *121*, 496–504.
- (97) Son, H.-H.; Moon, J.-Y.; Seo, H. S.; Kim, H. H.; Chung, B. C.; Choi, M. H. High-temperature GC-MS-based serum cholesterol signatures may reveal sex differences in vasospastic angina. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 155–162.
- (98) Cacas, J.-L.; Melsner, S.; Domergue, F.; Joubès, J.; Bourdenx, B.; Schmitter, J.-M.; Mongrand, S. Rapid nanoscale quantitative analysis of plant sphingolipid long-chain bases by GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 2745–2755.
- (99) Wang, K.; Jiang, D.; Sims, C. E.; Allbritton, N. L. Separation of fluorescently labeled phosphoinositides and sphingolipids by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *907*, 79–86.
- (100) Gao, F.; Zhang, Z.; Fu, X.; Li, W.; Wang, T.; Liu, H. Analysis of phospholipids by NACE with on-line ESI-MS. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 1418–1425.
- (101) Khandelwal, P.; Stryker, S.; Chao, H.; Aranibar, N.; Lawrence, R. M.; Madireddi, M.; Zhao, W.; Chen, L.; Reily, M. D. ¹H NMR-based lipidomics of rodent fur: species-specific lipid profiles and SCD1 inhibitor-related dermal toxicity. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 1366–1374.
- (102) Meneses, P.; Glonek, T. High resolution ³¹P NMR of extracted phospholipids. *J. Lipid*

- Res.* **1988**, *29*, 679–689.
- (103) Yu, Y.; Vidalino, L.; Anesi, A.; Macchi, P.; Guella, G. A lipidomics investigation of the induced hypoxia stress on HeLa cells by using MS and NMR techniques. *Mol. Biosyst.* **2014**, *10*, 878–890.
- (104) Tsai, M.; Ohniwa, R. L.; Kato, Y.; Takeshita, S. L.; Ohta, T.; Saito, S.; Hayashi, H.; Morikawa, K. Staphylococcus aureus requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity *BMC Microbiol.* **2011**, *11*, 13.
- (105) White, D. C.; Frerman, F. E. Extraction, characterization, and cellular localization of the lipids of Staphylococcus aureus *J. Bacteriol.* **1967**, *94*, 1854–1867.
- (106) Gründling, A.; Schneewind, O. Genes required for glycolipid synthesis and lipoteichoic acid anchoring in Staphylococcus aureus *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 2521–2530.
- (107) Dunn, W. B.; Broadhurst, D.; Begley, P.; Zelena, E.; Francis-McIntyre, S.; Anderson, N.; Brown, M.; Knowles, J. D.; Halsall, A.; Haselden, J. N.; Nicholls, A. W.; Wilson, I. D.; Kell, D. B.; Goodacre, R. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1060–1083.
- (108) Dunn, W. B.; Wilson, I. D.; Nicholls, A. W.; Broadhurst, D. The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans *Bioanalysis* **2012**, *4*, 2249–2264.
- (109) Wang, S.-Y.; Kuo, C.-H.; Tseng, Y. J. Batch Normalizer: a fast total abundance regression calibration method to simultaneously adjust batch and injection order effects in liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics data and comparison with current calibration met *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1037–1046.
- (110) Godzien, J.; Ciborowski, M.; Angulo, S.; Ruperez, F. J.; Martínez, M. P.; Señorans, F. J.; Cifuentes, A.; Ibañez, E.; Barbas, C. Metabolomic approach with LC-QTOF to study the effect of a nutraceutical treatment on urine of diabetic rats *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 837–844.
- (111) Sartain, M. J.; Dick, D. L.; Rithner, C. D.; Crick, D. C.; Belisle, J. T. Lipidomic analyses of Mycobacterium tuberculosis based on accurate mass measurements and the novel “Mtb LipidDB” *J. Lipid Res.* **2011**, *52*, 861–872.
- (112) Chen, S.; Kong, H.; Lu, X.; Li, Y.; Yin, P.; Zeng, Z.; Xu, G. Pseudotargeted metabolomics

method and its application in serum biomarker discovery for hepatocellular carcinoma based on ultra high-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8326–8333.

- (113) Zhou, B.; Xiao, J. F.; Tuli, L.; Ransom, H. W. LC-MS-based metabolomics *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 470–481.
- (114) Hewelt-Belka, W.; Nakonieczna, J.; Belka, M.; Bączek, T.; Namieśnik, J.; Kot-Wasik, A. Comprehensive methodology for *Staphylococcus aureus* lipidomics by liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1362*, 62–74.
- (115) Nakonieczna, J.; Kossakowska-Zwierucho, M.; Filipiak, M.; Hewelt-Belka, W.; Grinholc, M.; Bielawski, K. P. Photoinactivation of *Staphylococcus aureus* using protoporphyrin IX: the role of haem-regulated transporter HrtA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 1393–1405.
- (116) Hewelt-Belka, W.; Nakonieczna, J.; Belka, M.; Bączek, T.; Namieśnik, J.; Kot-Wasik, A. Untargeted Lipidomics Reveals Differences in the Lipid Pattern among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Resistant and Sensitive to Antibiotics. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 914–922.



DOROBEK NAUKOWY

8 Dorobek naukowy

Publikacje:

P. Pikul, M. Jamrógiewicz, J. Nowakowska, **W. Hewelt-Belka**, K. Ciura, Forced Degradation Studies of Ivabradine and In Silico Toxicology Predictions for Its New Designated Impurities. *Frontiers of Pharmacology*, 7:117, 2016. doi: 10.3389/fphar.2016.00117 (IF=4.269)

W. Hewelt-Belka, J. Nakonieczna, M. Belka, T. Bączek, J. Namieśnik, A. Kot-Wasik, Untargeted Lipidomics Reveals Differences in the Lipid Pattern among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Resistant and Sensitive to Antibiotics., *Journal of Proteome Research*, 15, 2016, str. 914–22. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00915 (IF=4.341)

J. Nakonieczna, M. Kossakowska-Zwierucho, M. Filipiak, **W. Hewelt-Belka**, M. Grinholc, K.P. Bielawski, Photoinactivation of *Staphylococcus aureus* using protoporphyrin IX: the role of haem-regulated transporter HrtA., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2016, str. 1393–405. doi:10.1007/s00253-015-7145-5 (IF= 3.882)

S. Ulenberg, M. Belka, M. Król, F. Herold, **W. Hewelt-Belka**, A. Kot-Wasik, T. Bączek, Prediction of overall *in vitro* microsomal stability of drug candidates based on molecular modeling and support vector machines. case study of novel arylpiperazines derivatives, *PLoS ONE* 10 (3): e0122772, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0122772 (IF= 3.535)

W. Hewelt-Belka, J. Nakonieczna, M. Belka, T. Bączek, J. Namieśnik, A. Kot-Wasik, Comprehensive methodology for *Staphylococcus aureus* lipidomics by liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1362, 2014, str. 62-74. doi: 10.1016/j.chroma.2014.08.020 (IF= 4.150)

M. Belka, **W. Hewelt-Belka**, J. Sławiński, T. Bączek, Mass spectrometry based identification of geometric isomers during metabolic stability study of a new cytotoxic sulfonamide derivatives supported by quantitative structure-retention relationships, *PLoS ONE* 9, (6): e98096, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0098096 (IF= 3.535)

W. Hewelt-Belka, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, *Chemia analityczna w lipidomice, Analityka: nauka i praktyka*, 1, 2014, str. 4-12

Skrypty:

A. Jakimska, **W. Hewelt-Belka**, K. Wilczewska, A. Kot-Wasik, *Nowoczesna chromatografia cieczowa*, Wyd. PG, 2014

K. Wilczewska, **W. Hewelt-Belka**, P. Kubica, A. Kot-Wasik, A. Wasik, Analiza ilościowa w chromatografii cieczowej, Wyd. PG, 2014

Materiały konferencyjne:

Plakaty:

W. Hewelt-Belka, M. Janicka, M. Kropidłowska, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Kondensaty wydychanego powietrza - źródło biomarkerów układu oddechowego., VIII Konferencja :Analityczne Zastosowania Chromatografii Cieczowej, Warszawa, Polska, 23-24 października, 2014

A. Potęga, **W. Hewelt-Belka**, O. Siewruk, K. Zapała, Z. Mazerska, Electrochemical simulation of enzymatic transformations studied for the selected antitumor acridine derivatives., VI Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, Polska, 18-20 wrzesień, 2014

W. Hewelt-Belka, J. Nakonieczna, A Mass Spectrometry-based Approach to Identify Minute Differences Between *Staphylococcus aureus* Wild Type Strain and Its Isogenic hrtA-Mutant Lipid Content. Possible Role in Antimicrobial Photoinactivation., 114th General Meeting, American Society for Microbiology, Boston, Massachusetts, USA, 17-20 maj, 2014

W. Hewelt-Belka, P. Kubica, K. Wilczewska, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Comparison of mobile phase additives for determination of amino acids in reversed phase mode, *19th International Symposium on Separation Sciences, New Achievement In Chromatography*, Porec, Chorwacja, 25-29 wrzesień, 2013

W. Hewelt-Belka, J. Nakonieczna, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Development of LC-MS-Q-TOF-MS method for comprehensive nontargeted lipid profiling of *Staphylococcus aureus*, *19th International Symposium on Separation Sciences, New Achievement In Chromatography*, Porec, Chorwacja, 25-29 wrzesień, 2013

A. Jakimska, **W. Hewelt-Belka**, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Elucidation of degradation pathway of furosemide by UPLC-QTOF-MS, *19th International Symposium on Separation Sciences, New Achievement In Chromatography*, Porec, Chorwacja, 25-29 wrzesień, 2013

A. Jakimska, **W. Hewelt-Belka**, Agata Kot-Wasik, Jacek Namieśnik, Occurrence of caffeine in the aqueous environment by SPE-HPLC-APCI-MS/MS, *19th International Symposium on Separation Sciences: New Achievement in Chromatography*, Porec, Chorwacja, 25-29 wrzesień, 2013

A. Jakimska, K. Wilczewska, **W. Hewelt-Belka**, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, Photodegradation of Tetracycline Antibiotics in Natural Water Samples, *39th International*

Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam, Holandia, 16-20 czerwiec 2013

K. Wilczewska, A. Jakimska, **W. Hewelt-Belka**, A. Wasik, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, A Simple and Rapid Method for Simultaneous Determination of Food Additives in Beverages and Soft Drinks, *39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Amsterdam, Holandia, 16-20 czerwiec 2013

M. Belka, S. Ulenberg, **W. Hewelt-Belka**, M. Król, F. Herold, T. Bączek, Metabolic stability study of novel arylpiperazine derivatives - potent antidepressive drugs, 7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences "Interdisciplinary research for pharmacy", Gdańsk, Polska, 24-25 maj 2013

Granty

Porównanie lipidowych odcisków palca szczepów gronkowca złocistego z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-Q-TOF-MS) i zaawansowanych technik chemometrycznych, grant PRELUDIUM 7, okres realizacji 02.2015-08.2016

Staż naukowe

26 styczeń 2014 – 25 lipiec 2014, National Chiao Tung University, Department of Applied Chemistry, Hsinchu, Tajwan



ZAŁĄCZNIK 1



ZAŁĄCZNIK 2



ZAŁĄCZNIK 3

