



## **Липидомиката като иновативен, модерен и евтин метод за изпитване и анализ на патогенни резистентни бактерии**

### **Научен обзор**

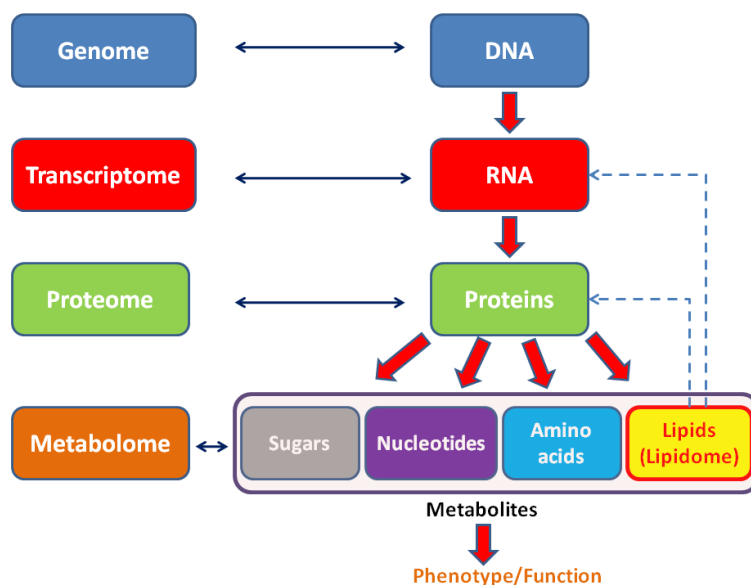
Увеличаването на броя на устойчивите на лекарства микроорганизми е глобално предизвикателство, което налага спешно нови решения не само за превенция и лечение, но и за детекция и типизиране на устойчиви на антибиотици изолати. Бавните стандартни методи за диагностика на чувствителността и тясно профилираните бързи ДНК-базирани молекулярни тестове са основните пречки за навременното и насочено антибиотично лечение и/или предприемане на съвременни мерки за контрол на инфекциите. Ранното и адекватно лечение е от жизненоважно значение за успешния клиничен резултат. Освен това целевата терапия намалява съпътстващите щети на физиологичната флора и риска от развитие на резистентност.

Фенотипното изследване за антимикуробна чувствителност (AST) представлява референтния стандарт и разчита на откриване на растеж или инхибиране на микроорганизмите в присъствието на антибиотик. Въпреки че AST е най-известен и стандартизиран метод за детекция на резистентност, независимо от механизмите на АМР, тези стандартни методи изискват около 1 до 3 дни, за да се даде резултат. Някои ензимни или ДНК-базирани тестове са в състояние да покажат резултат в рамките на 24 часа, но те позволяват определяне на някои специфични механизми за резистентност. Например PCR тестовете, предназначени за откриване на резистентни гени или ензимните тестове, в Грам-отрицателните бактерии, не откриват резистентност към някои антимикуробни средства поради различие в механизма на резистентност.

Има новоразработени методи за бързо откриване на антибиотична резистентност въз основа на маспектрометрия (MALDI-TOF MS), както и липидомиката. Тези два подхода позволяват универсално фенотипно AST, което осигурява бърза диференциация между резистентни и чувствителни щамове, независимо от микробните видове, антимикуробните средства или основния механизъм на резистентност. В немалко проучвания са изпитани оптималните условия за тестване, водещи до бърз и точен анализ, който лесно може да се извършва мануално от лабораторен персонал, а е подходящ и за автоматизирана лабораторна техника, и едновременното тестване на голям брой антимикуробни средства. В допълнение към опростената подготовка на пробите за липиден анализ, се предлага прост и надежден алгоритъм за анализ на данните.

До момента се разчиташе в диагностичните схеми основно на охарактеризиране на конкретни генни локуси, отговорни за антимикуробната резистентност (геномика) или на белтъчния състав в мембраните на бактериалните патогени (протеомика), но дойде време да се обърне внимание и на липидомиката или ролята на липидите във физиологията и патологията. Като се има предвид, че хиляди различни липиди присъстват в една клетка и че много от тези липиди участват в модулирането на всички процеси, липидомиката описва и количествено анализира липидите в човешкото тяло, например телесните течности, клетки и тъкани. Липидомиката интегрира тези данни с познаването на техните протеинови цели, т.е. метаболитните ензими и транспортъорите,

както и на съответните гени и регулаторните аспекти на тези физиологични системи. Преди всичко, разбирането за клетъчните мембрани е възможно само с изчерпателно разбиране на техният липиден състав.



Схематично представени различни подходи, съобразно целевия тестван компонент – ДНК, РНК, Липиди, белтъци

Липидите са известни като високоенергийни горивни молекули и акумулиращи молекули за клетъчна поддръжка. Освен това липидите са градивните елементи на клетъчните мембрани, осигуряващи на тези мембрани физически характеристики. Всички липиди показват напречни и странични хетерогенности, които са динамични и регулирани от специфични химични и физични механизми, които съставляват липидния метаболизъм. Клетъчните мембрани от своя страна могат да формират динамични платформи, подредени в течност (сфинголипидни-холестеролни рафтове), което дава на липидомиката нова цел в проучванията. В допълнение, много от междинните липидни метаболити изпълняват като втора функция ролята на първични или вторични трансмитери. Синтезът и клирънсът им са под строг регулаторен контрол. И не на последно място, разнообразието от липиди служи за закрепване на протеините и гликаните към мембранните повърхности, като по този начин влияе и регулира техните функции. Най-важен е фактът, че много от широко разпространените болести, които измъчват човечеството, са свързани с липидите. Основни примери са сърдечно-съдови заболявания, свързани със затлъстяването диабет тип-2 и инсулт. Други основни заболявания като рак и Болестта на Алцхаймер също са обвързани с липидния баланс. В допълнение към тези нарушения, има много други заболявания, които са пряко причинени от наследствени дефекти в липидните метаболитни ензими и транспортери, като дефекти в синтеза на холестерола и липидните депа. Липидите също играят важна роля в автоимунните заболявания и действат като (съ)приемници за бактерии, вируси и токсини. Увеличаването на познанията ни за промените, свързани с болестите в липидните модели и интегрирането им с протеомни и геномни данни, ще предостави нови основни биомедицински прозрения; по този начин могат да се очакват широкообхватни възможности за диагностично приложение (прогностична оценка, диагностика и мониторинг), както и за развитието на превенцията и новите терапевтични подходи.

Координацията и интеграцията на интердисциплинарните научноизследователски усилия са признати от ЕС като основа за насърчаване на развитието на структурната медицина като дисциплина в Европа. Основните и приложните биомедицински изследвания са от решаващо значение за по-доброто разбиране на жизнените процеси. Биомедицинските изследвания, които са насочени към задълбочаване на фундаменталните познания за структурите на молекулите и техните взаимодействия, се обединяват с термина „Структурна медицина“. Тя ще помогне за разработването на подобрени диагностични инструменти и подходящо медицинско лечение.

### **Липидология и липидомика**

Докато Липидологията е общата наука на липидите, терминът "липидомика" има различно значение. Липидомиката обхваща всичко, свързано с изучаването на липидома. По този начин, липидомиката обхваща количествено пространствено и времево определяне и охарактеризиране на всички липиди, липидни класове и видове (липидом). В допълнение, липидомиката включва изследване на липид-метаболизиращите ензимни системи и липидните транспортери, и двете от които определят локалната концентрация на липидите, както и на техните гени и регулацията им. И накрая, липидомиката засяга липидната функция, която не може да бъде разбрана без задълбочено разбиране на физическата основа на липидното поведение, особено на липидните взаимодействия. Липидомиката е част от метаболомиката, която е систематично изследване на уникалните химични свойства и характеристики, свързани с всички клетъчни процеси.

### **Липидомика, новопоявена дисциплина в биологията**

Липидите се класифицират в малък брой класове и подкласове. Появата на липидомиката датира от 2003 г. и е напреднала значително през последните години, до голяма степен поради развитието на маспектрометрията (MS). Бързият напредък в техниките и техните приложения правят необходимото своевременно преразглеждане на тези аспекти. В тази наука на първо място се разглеждат MS -базирани техники за анализ на липидите. Тези техники са различни при отсъствие или наличие на течна хроматография (LC) преди маспектрометричен анализ. Те също могат да бъдат различни в аналитичното си покритие (напр. "целеви" спрямо "глобален/машабен" анализ). След сравняване на техниките в диагностиката, биват подложени на обсъждане приложенията на липидомиката за различни клинични състояния, за различни заболявания, които са се появили през последните няколко години или пък като метод за преборване на наболелия проблем AMP.

### **Липидите отдавна са пренебрегвани. Защо?**

Защото инструментите за анализ на липидното разнообразие не са били на разположение доскоро. Чрез разработването на маспектрометрични методи за първи път може количествено да бъдат анализирани различните липидни молекулни видове в биологични проби. Този забележителен пробив ще даде възможност да се разберат по-добре мембранните системи, които са отговорни за производството и съхраняването на енергия в клетките, за транспортирането през и между клетъчните мембрани, както и за сигнализирането в и извън клетките. Изследванията по тези важни теми досега са се концентрирали върху участващите протеини и до голяма степен са оставили липидите

на заден план. Клетките се ангажират с големи количества химическа енергия, за да синтезират хиляди различни липидни молекули и сега е наложително да се проучи как тези химични съставки допринасят за функционирането на тялото, здравето и болестите. На нивото на целия човешки организъм има сложна „машина“ за избирателно поемане на липиди от храната и за транспортиране на липиди между тъканите през кръвта и лимфата. За да се компенсира липсата на достатъчно информация за този функционално важен клас биомолекули, Европа се нуждае от мултидисциплинарна научноизследователска инициатива, насочена към липидологията и липидомиката. За сравнение, в САЩ и Япония са създадени консорциуми и те работят с пълна скорост от години в направление липидомика. Рамковата програма 7 на ЕС, стартирана през 2006 г., се опитва да компенсира и е отпуснала сериозни финансови средства за научни изследвания в направление липидомика. Новата маспектрометрична методология за липиден анализ до голяма степен е разработена в Европа. Основните познания за организацията на клетъчните мембрани и за ролята на специфични липидни молекули в клетъчното сигнализиране идват от европейските лаборатории. Това доказва, че Европа има потенциала да се справи както с основните, така и приложните изследвания, които ще бъдат необходими, за да се разбере как липидите допринасят за клетъчната и телесната функция и да се заеме с научното предизвикателство за установяване на липидите в патогенезата на болестта. В Европа следва да бъдат създадени специфични бази данни, в които да се съхранява получената информация от различните научни проучвания по темата, съдържащи подгрупи от данни за липидната структура, липидната метаболомика, протеомиката и геномиката.

Като се има предвид потенциала на количествените измервания, предлагани от новите технологии, става възможен истински системен биологичен подход към липидомиката. Необходимо да се привлекат повече химици и физици в тази област, защото биологичното и медицинско значение на липидите е резултат от техните химични и физични свойства. Това ще изисква обучение на изследователи с опит в областта на кинетиката и термодинамиката, които едновременно имат интерес към биологията и медицината.

### **Динамика и молекулярна организация на липидите:**

Две основни характеристики отличават липидите от другите биомолекули. Първо, за разлика от захарите или аминокиселините, по-голямата част от липидите са неразтворими във вода. Това основно физическо свойство кара липидите да бъдат неподходящи за проста „водна“ биохимична методология. Второто по-скоро уникално свойство на липидите, особено във водна среда, е самоагрегацията, т.е. липидите обикновено образуват агрегати от различни видове, най-вече разширени структури, известни като бислой. Двуслойната основа на клетъчната мембрана се образува от амфипатични/амфибилни липидни молекули, т.е. молекули, които притежават едновременно хидрофилна част в контакт с водата, и липофилна част, която остава изолирана от водната среда. Биологичните мембрани са водонепроницаеми структури, състоящи се от липиди и протеини. Те притежават значителна степен на свобода да се дифундират, както ротационно, така и странично, в равнината на мембраната.

Мембранните форми на липидните агрегати са уникални, защото те се държат заедно от нековалентни връзки, образувани от хидрофобния ефект. Не винаги правилно разбран, хидрофобният ефект възниква не само от афинитета на липидните хидрофобни съединения един към друг, но главно от сравнително по-големия афинитет на водните молекули помежду си и с полярните части на амфипатичните липиди. Въпреки това, разликата във физическите свойства на различните видове липиди може да доведе до

хетерогенност в определени мембрани. Биофизичните проучвания ясно показват неизмерими фази в липидните двуслои. Понастоящем има все по-големи доказателства за ролята на сфинголипид-холестеролните агрегати при формирането на динамични платформи в клетъчните мембрани, които функционират при трансдукцията на сигналите и транспорта на мембраните. Някои вируси като HIV, грип и вируса на ебола се покриват с подобна на липидна мембрана, обогатена със сфинголипид-холестерол при екскреция от заразените клетки. Сега е необходима повече работа върху физическите и химичните принципи, които са в основата на фазовото поведение на липидните бислоеве, за да се разбере как това модулира биохимията в мембраните.

Хидрофобността и самоагрегацията на липидите са в огромна полза за клетките и организмите. Хидрофобността осигурява ефективна бариера за дифузията на най-вече водоразтворимите биомолекули, така че биологичната мембрана представлява структурната и функционална граница на клетката, както и на вътреклетъчните органели. При много гръбначни животни, включително бозайниците, слой от специфични липиди, представлява ефективно средство за избягване на неконтролирано изпаряване на водата. Миелинов слой, който изолира аксоните в нервните клетки, е друг липиден принцип при работа при нервната проводимост. И накрая, вътре в клетъчните липидни капчици, агрегатите на предимно хидрофобни липиди като триацилглицероли, заобиколени от специфични протеини и амфипатични липиди, са решение на проблема със съхраняването на максимално енергийно гориво в най-малко пространство.

### **Разбиране на липидния метаболизъм:**

Функциите на хиляди различни липиди се определят от тяхната концентрация на определено място, във времето. Развитието на нови аналитични техники, по-специално масспектрометрия, ще позволи идентифицирането и количественото определяне на почти всеки липид, с все по-голяма разделителна способност във времето и пространството. Липидомиката като анализ трябва да се прилага към добре проучени човешки заболявания, свързани с липидния метаболизъм, за да се определи дали тази техника предлага нови предимства както в диагностиката, така и в прогнозната биология, както и като инструмент за оценка на напредъка на специфични терапии. Ясен пример за потенциала на липидомиката при диагностицирането на човешките генетични заболявания в комбинация с масспектрометричен анализ на кръвни проби от новородени за различни ацилкарнитини, недвусмислено идентифицира лезиите в специфични етапи на окисляване на митохондриалните мастни киселини.

### **Липидомиката като портал към нова биохимия:**

Съществуват множество липидни видове в ниски концентрации, за които по същество няма информация относно структурата, биосинтетичната или деградационната им биохимия или кодиращите им гени. Научният труд по тетралинолеил-кардиолипин (*tetralinoleil-kardiolipin*) синтеза осигурява скорошен пример за това как изясняването на структурата на незначителен липид предоставя портал към експериментално изследване, което успешно води до определяне на нов биосинтетичен път от огромно значение. Тетралинолеил-кардиолипин е от съществено значение за нормалната митохондриална функция, а дефектният му синтез се проявява при генетичната болест, свързана със синдрома на Барт. Очаква се, че липидомиката, съчетана с масспектрометрия, ще стимулира идентифицирането на нови биохимични пътища и гени, чието значение в клетъчната биология и биологията на организмите може да се заключи чрез обратни генетични подходи.

Локалната концентрация на липидите се определя от фино настроен процес, включващ синтез, транспорт и метаболизъм. Докато метаболизмът е катализиран, обмяната на липиди между различните среди се определя главно от физическите свойства на липидите, но тук транспортните протеини също играят важна роля. По този начин, за да се разбере как се регулира локалната липидна концентрация, е важно да се изследва активността на ензимите и транспортерите, топологията им и как те се регулират на транскрипционно и посттранскрипционно ниво. Само чрез такова подробно познаване на процесите, участващи в липидната хомеостаза, ще осигурят подробни знания за принципите на дизайна на системата, ще бъдат идентифицирани нейните слаби места и ще могат да се дефинират насоки в създаването на ефективни и ефикасни интервенции при лечение на много заболявания и инфекции. Още веднъж трябва да се подчертае, че липидомът не трябва да се разглежда като нещо независимо от генома, транскриптома или метаболома.

### **Липидна сигнализация и болести:**

Клетъчната сигнализация обхваща биохимичните събития, следващи връзката на рецепторите, които водят или до положителни или до отрицателни клетъчни съдби. Липидите могат да функционират като вътреклетъчни посланици, които се генерират чрез активиране на сигнални ензими. Например, фосфорилирането на мембранния липиден фосфатидилинозитол може да доведе до седем отделни инозитолови фосфолипиди в различни положения на инозитоловия пръстен. Всеки от тези липиди функционира като сигнал, а мутациите в отговорните кинази и фосфатази са свързани с множество заболявания, включително диабет тип 2 и рак. Освен това фосфоинозитидите участват в инвазивността на патогенните бактерии като *Listeria monocytogenes* или *Shigella flexneri*.

Клетъчните фосфолипиди са източник на много вътреклетъчни липидни посланици. Фосфолипази А2 освобождават арахидонова киселина, която може да се трансформира в простагландини, тромбокساني или левкотриени. Тези ейкозаноиди играят важна роля за произхода на възпалителните места при ревматоиден артрит, сърдечно-съдови и невродегенеративни заболявания. Други високоактивни липиди, получени от фосфолипазите, са фактор за активиране на тромбоцитите (PAF), силен медиатор на възпалението, екстрацелуларната агонистка лизофосфатидна киселина (LPA), която участва в механизми, свързани с туморогенезата, включително ангиогенезата, и диацилглицерол, който регулира активността на протеин киназа С (PKC). PKC има функция за потискане на апоптозата, която също се регулира чрез церамид/сфингозин-1-фосфат реостат (сигнални продукти на сфинголипидния метаболизъм).

Множество немембранни липиди, като мастни киселини, лизофосфолипиди, жлъчни киселини и оксистероли, или внасяни в клетката или синтезирани ендогенно, са преки регулатори на генната експресия. Те са независими от класическата транскрипционна регулация на хомеостазата на холестерола, открита от Браун и Голдщайн и колеги, която работи чрез сензори, които активират протеолитичното производство на транскрипционен фактор. Тези констатации подчертават необходимостта от засилване на основните изследвания за разбиране на липидната хомеостаза в борбата с болестите, свързани с липидите.

Най-важен е въпросът как специфични липид-протеинови взаимодействия влияят върху активността на протеина в клетъчните мембрани. Последните структури на мембранните протеини дават първите улики за това как липидите могат да изпълняват такива функции.

Тъй като липидомиката се занимава с всички липиди и техните ензими и гени, тя е изправена пред огромното предизвикателство да се наложи и да се развият подходящи технологии. Те трябва да позволяват изчерпателни измервания на експресията, местоположението и регулирането на липидите, ензимите и гените във времето. Въвеждането на техники за йонизация като електроспрей йонизация (ESI) и лазерна десорбция/йонизация (MALDI) революционизират липидния анализ, което прави полярните липиди достъпни за масспектрометричен анализ. Сега са разработени множество методологии за структурния анализ на комплексни липиди, както и количествено разпространение на сложни липидни смеси. От друга страна, съответните ензими трябва да бъдат идентифицирани, като се използват (обратни) генетични, молекулярно биологични и информационни подходи.

## **Липидомика- Работен процес и техника**

### **Стандартен работен процес за изолиране, пречистване и определяне на липиди:**

Типичният работен процес за липидомен анализ на биологични проби включва подготовка на пробите, анализ чрез масспектрометрията и обработка на данни.

Преди всеки липидомен анализ е задължително правилното вземане на проби и съхранение на пробите. Факторите, засягащи условията на вземане на проби, предварителната обработка и съхранението на пробите, както и подбора на изследваните лица (особено в клиничните проучвания), са от съществено значение. След това правилно събраните проби се приготвят по начин, подходящ за адаптираните техники. Добавянето на подходящи вътрешни стандарти е от решаващо значение за количествения липидомен анализ. Вътрешните стандарти често се добавят съобразно общото тегло на белтъчини, мокра/суха тъкан или обем на течността за количествено определяне на липидите. Друг критичен фактор е постигането на достатъчна ефективност и възстановяване на отделните видове липиди от биологичните материали.

### **Чести методи за екстракция, използвани при липидомиката:**

1. **Модифициран метод Bligh & Dyer:** Хлороформ/метанол/ $H_2O$  (1:1:0.9, V/v/v) за екстракция на малко количество биологична проба (напр. < 50 mg тъкан). След разделянето на фазата общите липиди присъстват във фазата на хлороформ. Това е утвърден стандартен метод и широко практикуван. Недостатъците включват използването на опасния хлороформ и събиране на екстракт от хлороформ от долния слой (което може да причини пренасянето на водоразтворими примеси и трудности при автоматизацията на процеса след това).
2. **Метод на модифицираната екстракция:** Хлороформ/метанол (2:1, v/v) за извличане на биологична тъкан (напр. ~ 0.1 g), след което се добавя вода или 0, 9 % NaCl (0,2 обема), за да се измие екстракта от разтворителя. Той има подобни предимства и недостатъци като Bligh & Dyer метод.
3. **Метод МТВЕ:** метил терт-бутил етер (МТВЕ)/метанол/вода (5:1.5:1.45, v/v/v). Този метод решава някои от трудностите при използването с хлороформните методи, тъй като МТВЕ се намира в горния слой след разделянето на фазата и следователно е по-възможна за висока производителност и автоматизация. Недостатък е, че МТВЕ фазата съдържа значително количество воден компонент, който може да пренася водоразтворими замърсители.
4. **Метод на Bume:** бутанол/метанол (Bume, 3:1, v/v) към малък обем водна фаза, се добавя равен обем хептан/етилацетат (3:1, v/v), и след това се добавя 1 % оцетна

киселина (равен обем на Bute), за да се предизвика разделяне на фазата. Този метод може да компенсира горепосочените методи с по-малко водоразтворими замърсители, пренесени в органичната фаза. Неговият недостатък е трудното изпаряване на бутанолния компонент в органичната фаза.

### Липидно разделяне:

Най-простият метод за липидно разделяне е използването на тънкослойна хроматография (TLC). Въпреки че не е толкова чувствителен, колкото другите методи за откриване на липиди, той предлага бърз и изчерпателен скрининг инструмент преди по-чувствителни и сложни техники. Твърдофазната хроматография (SPE) е полезна за бързо, подготвително разделяне на суровите липидни смеси в различни липидни класове. Това включва използването на предварително опаковани колони, съдържащи силициев диоксид или други стационарни фази за отделяне на глицерофосфолипиди, мастни киселини, холестерилови естери, глицеролипиди и стерини от сурови липидни смеси. Високопроизводителната течна хроматография (HPLC или LC) се използва широко при липидомния анализ за отделяне на липиди преди маспектрофотометричния анализ. Разделянето може да се постигне чрез HPLC с нормална фаза (NP) или HPLC с обратна фаза (RP). Например, NP-HPLC ефективно разделя глицерофосфолипидите въз основа на полярността на групата на главата, докато RP-HPLC ефективно разделя мастни киселини като ейкозаноиди въз основа на дължината на веригата, степента на ненаситеност и заместване. За глобални, нецелеве липидомни изследвания е обичайно да се използват както RP, така и NP или колони с течна хроматография с хидрофилно взаимодействие (HILC) за повишено покритие на липидомите. По този начин приложението на нанопоточна течна хроматография (nLC) се оказва най-ефективно за подобряване както на общата чувствителност на измерване, така и на липидомното покритие за по-мощен липидомен анализ.

След екстракцията някои незадължителни стъпки могат да бъдат приложени преди анализа посредством MS. Една от възможностите е да се опрости сложността на екстракта, което е особено важно за директния инфузионен *shotgun lipidomics* подход, тъй като той не прилага хроматография за отделяне или обогатяване преди анализа на MS. Това може да се направи чрез физически подходи (напр. разделяне на течност/натечност или чрез екстракция на твърда фаза, за да се разделят полярни и неполярни липиди) или химически подходи (напр. базова хидролиза за обогатяване на сфинголипиди от сложни липидни смеси, съдържащи високо съдържание фосфолипиди и/или глицероли). Другият вариант е екстрактите да бъдат извлечени чрез химическо маркиране на специфични функционални групи от липидите. Тази опция е най-вече полезна, когато липидите, представляващи интерес нямат присъщи заредени елементи, или липсват характерни или чувствителни модели на фрагментация по време на анализа посредством маспектрометрията (MS/MS) (който ограничава аналитичната чувствителност и специфичността чрез прекурсорно йонно сканиране (PIS) или неутрално сканиране (NLS) в *shotgun lipidomics* подхода или чрез избрани/мултипликационни реакции (SRM/MRM) в LC-базирани подходи).

По време на анализа на MS липидните разтвори се анализират или чрез *shotgun lipidomics* подхода, или чрез методи на основата на хроматография, по-специално на основата на LC. Като алтернатива, тъканните проби или клетъчните проби се представят директно на изображенията на MS.

### Откриване на липиди:



Напредъкът на съвременната липидомика е значително ускорен от развитието на спектрометрични методи като цяло и техники за мека йонизация за масова спектрометрия като електроспрей йонизация (ESI), десорбционна електроспрей йонизация (DESI), и матрично подпомагана лазер десорбция / йонизация (MALDI).

Често използвани йонизационни техники в съвременната масспектрометрия за липидомика са:

- **Йонизация на електроспрей (ESI)**

Йонизационна техника, използвана в масспектрометрията, която използва електроспрей, произведен чрез прилагане на силно електрическо поле към течност, преминаваща през капиларна тръба, за да се създаде фин аерозол, от който йоните се образуват.

- **Лазерна десорбция/йонизация с матрица (MALDI)**

Йонизационна техника, използвана в масспектрометрията, която позволява анализа на големи и/или лабилни молекули (напр. пептиди, протеини, липиди и полимери) и е особено полезна за MS изображения на тъканни или клетъчни проби. Тази техника включва използването на проби/аналити в матрица, която поглъща енергия от дължината на вълната на лазера. Импулсният лазер облъчва анализите, предизвиквайки аблация и десорбция на анализите и материала на матрицата, за да се улесни йонизацията на анализираните молекули в горещата струя на аблирани газове.

- **Химична йонизация на атмосферното налягане (APCI)**

Йонизационна техника, която използва газ-фазни йонно-молекулни реакции при атмосферното налягане.

- **Фотойонизация на атмосферното налягане (APPI)**

Полезна алтернативна йонизационна техника за анализ на съединения, които йонизират слабо от ESI и APCI. Тази техника използва вакуумно-ултравиолетова лампа, предназначена за откриване на фотойонизация в газовата хроматография като източник на 10-eV фотони.

- **Вторична йонна масспектрометрия (SIMS),** използваща сребърни или златни йони като първични йони, тя е най-чувствителната повърхностна аналитична техника, която се използва за анализ на състава на твърди повърхности или тънки слоеве чрез бомбардиране на повърхността с фокусиран първичен йонен лъч.

- **Десорбция ESI (DESI)**

Техника на йонизация, която е комбинация от ESI и десорбционни йонизационни методи. Йонизацията се осъществява чрез пневматично насочване на заредена електроспрейна мъгла към повърхността на пробата, където следващите капчици пренасят десорбирани, йонизирани аналити, които след това навлизат в масспектрометъра.

След йонизацията на липидите техниката за йонна мобилност може да се приложи като опция за допълнително измерване на йонната манипулация и разделяне преди анализа на MS. След това или *Full MS/MS* анализ или и двете могат да бъдат извършени в зависимост от това дали е желан целенасочен или глобален анализ.

Следва да се признае, че масовата разделителна способност по-висока от 75 000  $m/z$  800 изглежда необходима, за да се избегне евентуално припокриване между липидните видове и други усложнения. След анализа на MS, данните се показват като MS спектри, MS/MS спектри, йонна хроматограма (включително TIC или XIC; LC) или изображения (само MS изображения).

**Често използваните масспектрометрични техники в липидомиката са:**

- **Йонно сканиране на продукта**

Техника за тандемна масспектрометрия, при която първият масанализатор избира специфичен прекурсорен йон, докато вторият масанализатор открива всички получени частици йони от фрагментирането на избрания прекурсор.

- **Йонно сканиране на прекурсора (PIS)**

Тандемна масспектрометрична техника, при която първият масанализатор сканира всички прекурсорни йони, докато вторият масанализатор следи само избрания фрагментен йон. Избраният фрагментен йон съответства на общ фрагментен йон на прекурсорите; следователно всички прекурсори, които произвеждат посочения фрагментен йон по време на раздробяването, се следят.

- **Неутрално сканиране на загубите (NLS)**

Тандемна масспектрометрична техника, при която първият масанализатор сканира всички прекурсорни йони, докато вторият масанализатор сканира частните йони, зададени от първия масанализатор. Това компенсиране съответства на обща неутрална загуба от прекурсорните йони; следователно всички прекурсори, които претърпяват загуба на посочения неутрален фрагмент, се следят.

- **SRM/MRM**

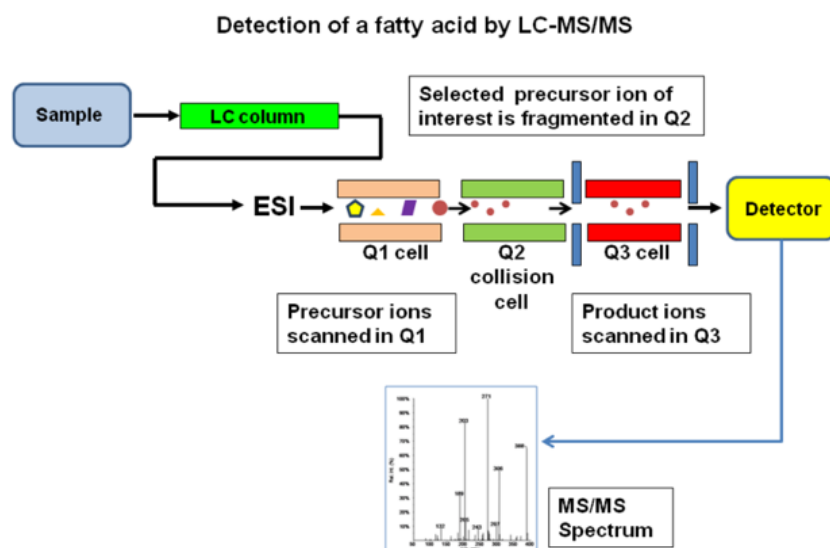
Несканиращ масспектрометричен метод, използван в целенасочения анализ, който използва два масанализатора като статични масови филтри за наблюдение на определен фрагментен йон от определен прекурсорен йон.

След MS спектралните данни се обработват задължително за коригиране на ефектите от наличието на изотопни клъстери върху моноизотопните пикови интензитети, освен ако няма наличен вътрешен стандарт и калибрираща крива за отделните видове в случая на липидомика посредством LC, последвано от идентифициране и количествено определяне на отделните липидни видове въз основа на аналитични подходи. Тези качествени и количествени липидни данни се обработват чрез биоинформатични анализи, за да се изследват основните механизми на липидния метаболизъм и неговата регулация, отговорни за здравето на хората или пък за антимикробната резистентност на патогенни бактериални видове, или за откриване на биомаркери или разработване на целеви лекарства за конкретни заболявания или инфекции.

Както бе показано по-горе в изложението, липидите могат да бъдат анализирани директно от биологичните материали (т.е. изображения на MS) или след екстракция с органични разтворители. Биологичните липидни екстракти обикновено са сложни, включително разнообразието в липидните класове/подкласове/молекулните видове и огромния динамичен диапазон в ендогенното съдържание на отделните видове. Следователно намаляването на сложността на липидните екстракти е от съществено значение за надеждната и точна идентификация и количествено определяне на отделните видове в сложния екстракт. LC-базираните липидомни техники постигат разделяне и набогатяване на пробата с липидни класове, които са със слабо присъствие. Липидомиката е високоскоростен подход, но за сметка на запазването на сложността на липидния екстракт поради липсата на хроматографско отделяне.

Обработката на данни за диференциално профилиране обикновено протича през няколко етапа, включително манипулация на входния файл, спектрално филтриране, откриване на пикове, хроматографско подравняване, нормализиране, визуализация и експортиране на данни. Пример за софтуер за метаболитно профилиране е свободно достъпното Java-базирано приложение *Mzmine*. Наскоро софтуерът *MS-DIAL 4* беше интегриран с изчерпателен атлас на липидомите с време на задържане, напречно сечение

и информация за тандемна масспектрометрия за 117 липидни подкласа и 8051 липиди. Някои софтуерни пакети като *Markerview* включват многовариантен статистически анализ (например анализ на главните компоненти) и те ще бъдат полезни за идентифициране на корелациите в липидните метаболити, които са свързани с физиологичен фенотип, по-специално за развитието на липид-базирани биомаркери.



Схематично представен

целият работен процес на липидомиката

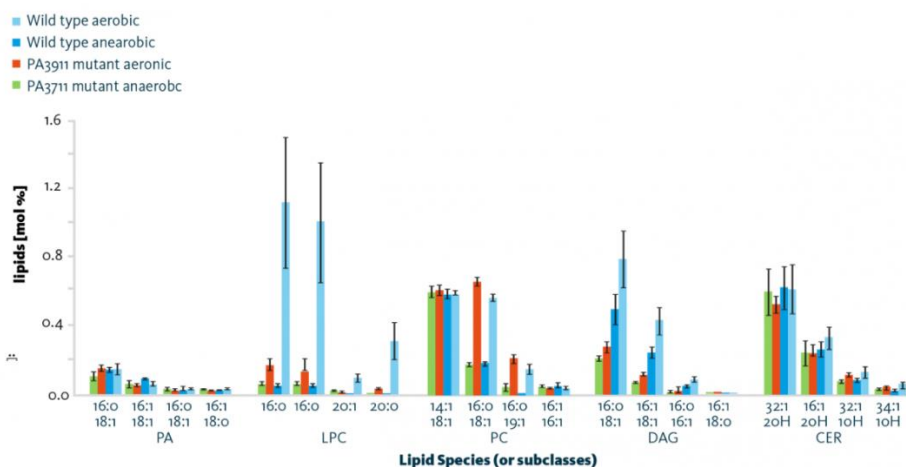
## Приложения на липидомиката:

### Антимикробна резистентност (AMP):

Липидомиката доказва ролята на липидния метаболизъм в резистентността на бактериите към антибиотици. Откриването и описанието на първото антибиотично съединение през 1928 г. е крайъгълен камък в областта на фармацевтичните изследвания, а развитието на по-нататъшни антибиотични средства помага на съвременната медицина да процъфтява. Въпреки че има алтернативни и безопасни антибиотици за повечето от устойчивите патогени, с течение на времето, някои бактерии развиват резистентност към множество антибиотици или са естествено мултирезистентни. По този начин, лекарите и изследователите са загрижени за напредъка на броя на случаите, включващи мултирезистентни бактерии, тъй като такива инфекции са трудни или дори невъзможни за лечение. Освен, че използват антибиотици съзнателно, за да забавят процеса на адаптация на бактериите и разработването на нови антибиотици, учените все повече проучват трети подход: Те търсят начини да направят мултирезистентни бактерии, податливи на вече съществуващи антибиотици (отново). Нарушаването на механизмите за антимикробна резистентност е по-лесно да се каже, отколкото да се направи. Подход за постигане на тази цел може да се крие в липидомиката, като наука, занимаваща се и с бактериалния липиден метаболизъм.

Екип от изследователи, от *Department of Chemical Biology, Helmholtz Centre for Infection Research* (<https://www.lipotype.com/lipidomics-applications/lipidomics-of-multi-resistant-bacteria/>) и <https://www.helmholtz-muenchen.de/helmholtz-zentrum-muenchen/index.html>), прилага мащабен анализ на липидомиката, за да изследва молекулярния липиден състав на *Pseudomonas aeruginosa*, широко разпространена бактерия, която може да причини заболявания като пневмония, септичен шок и други болнични инфекции. Мултирезистентната бактерия *P. aeruginosa* е „оборудвана“ с

висока естествена антибиотична резистентност и е известно, че развива по-голяма устойчивост по време на терапия с АМС, което я прави изключително трудна за преодоляване. *P. aeruginosa* е особена заплаха за имунокомпрометирани пациенти и индивиди с кистозна фиброза, които често са засегнати от персистираща инфекция с мултирезистентни бактерии. Екипът от молекулярни биолози и микробиолози сравни два щама *P. aeruginosa* - див тип и мутант без протеин PA3911. Изследователският екип излага двата щам на серия от антибиотици, и открива, че протеин PA3911 е важен за естествено високата антимикробна резистентност на бактерията. Структурен анализ на PA3911 разкрива, че този протеин се свързва специално с липидната фосфатидна киселина (PA), център за биосинтезата на разнообразен клас фосфолипиди, участващи в катализата на различни биосинтетични пътища. Следвайки тези резултати, екипът от учени е заинтересован да проучи разликите в състава на PA липидите и свързаните с PA метаболизма липиди в *P. aeruginosa*, за да разкрие начина на работа на PA3911. Мащабното проучване на *P. aeruginosa* показва значителни разлики в нивата на липидите, свързани с PA и PA, свързани с липидите между дивия тип и мутантния щам. По-конкретно, липидните нива, но също така съставът на молекулярно ниво на липидните класове: лизофосфатидилхолин (LPC), фосфатидилхолин (PC) и диацилглицерол (DAG) показват непреодолими разлики – липидни класове, които са свързани с фосфолипидния метаболизъм чрез основния PA. Тези констатации показват как протеин PA3911 поддържа фосфолипидната хомеостаза. Елиминирането на протеина дисбалансира фосфолипидната хомеостаза и значително увеличава чувствителността на *P. aeruginosa* към много антибиотици, подход, който е открит и разгадан чрез комбинация от изследвания.



### MS анализ на бактериалните липиди

Събирането и изследването на такива данни и научна информация, както и данни за липидния метаболизъм и липидния състав чрез *Lipotype Shotgun Lipidomics*, помага на инфектологията и медицината да идентифицират и охарактеризират микробните слаби места, което ще доведе до нови подходи и възможности за лечение на труднопреодолими инфекции от висок риск или развиване на новаторски подходи за лечение.

В много обстойно проучване на *June K. Dunnick, William M. O'Leary* със заглавие „*Correlation of Bacterial Lipid Composition with Antibiotic Resistance*“ е добре установено и изключително подробно представено, че бактериалните липиди са основни съставки на бактериалните мембрани и на Грам-отрицателните бактериални видове, но малко се знае за точните функции на липидите в тези структури. Въпреки това, има някои предположения, че бактериалният липиден състав или структурна подредба може да

предотврати влизането или свързването на някои антибиотици. Корелацията на бактериалния липиден състав с антибиотична резистентност е изследвана с особено внимание върху тези организми, при които резистентността може да е свързана с мембраната или обвивката или като функция от резистентност към тетрациклини и полимиксини. Хлороформ-метанол-екстрахираните липиди, фосфатидилетаноламинови фракции, както и мастни киселини от тези липидни фракции и общите мастни киселини са изследвани чрез използване на тънкослойна хроматография, газова хроматография и инфрачервена спектроскопия. Установени са последователни количествени разлики между състава на мастните киселини на чувствителни и резистентни щамове. Най-забележим е фактът, че при Грам-отрицателните организми, резистентните щамове показват намаляване на циклопропановите киселини в сравнение с чувствителните щамове. Установено е, че тези промени са присъщи на щамовете, а не поради етапа на растеж или на възрастта на културата. Не са отбелязани значителни качествени разлики. За разлика от това, такова изменение в съдържанието на мастни киселини не е наблюдавано при чувствителни към пеницилин и резистентни щамове на Грам-положителни коки. Тъй като значителни промени в състава на мастните киселини са отбелязани в Грам-отрицателните изолати, устойчиви на антибиотици, се предполага, че резистентността се корелира с мембранната обвивка и по-специално липидния състав. В този доклад и обстойно проучване се съобщава за открития за естеството на бактериалните липиди, получени от различни организми и корелацията на тези липидни състави с антибиотичната резистентност. Акцентът в този научен труд от далечната 1970г. е поставен върху обследването на случаите, в които се смята, че мястото на антибиотично действие се концентрира в бактериалната обвивка, както в случая на полимиксините, в случаите, в които антибиотичната резистентност се дължи на намалена пропускливост на мембраната, както при тетрациклините, или в случаите, в които резистентността е свързана с повишено липидно съдържание, както в случая с пеницилините. В проучването са използвани щамове *Escherichia coli*: *E. coli* Sc3552 устойчиви на тетрациклин (TC), *E. coli* Sc8280, устойчиви на тетрацилин (TC) и *E. coli* Sc8190, чувствителни към тетрациклин. *E. coli* Sc8280 е създаден чрез конюгиране на *E. coli* Sc8190 с *Shigella flexneri*, носещ R фактор 222, който се характеризира със сулфонамид-, стрептомицин-, хлорамфеникол- и тетрациклин- устойчив характер. *E. coli* B7350 е лабораторен щам, чувствителен към тетрациклин. Други щамове, които са използвани в проучването са на *Staphylococcus aureus*, резистентен на пеницилин (PR) (лабораторен щам) и щамът на *S. aureus* ATCC 12600, чувствителен към пеницилин. В научният труд са включени и двата полимиксин- резистентни и чувствителни щамове на *Klebsiella pneumoniae*, които са лабораторни щамове. Липидите са извлечени от сухите клетки по метода на Folch, Lees u Sloane Stanley. Тези липиди (определени FLS липиди или хлороформ-метанол-екстрахираните липиди) са отделени посредством тънкослойна хроматография върху силикагел. Бактериалните липидни класове, разделени от тънкослойна хроматография, се характеризират чрез сравняване на техните RF стойности с RF стойностите на стандартните липидни проби и реакцията на бактериалните липиди с няколко реактива, които са, както следва: йодни пари, нинхидрин, 2,7-дихлоро-флуоресцеин, молибден син, родамин, реагент за перийодат-Шиф и реагент на дифенила. Третирането на хроматограмите с йодни пари, родамин и 2,7-дихлоро- флуоресцеин улеснява откриването на всички липидни класове. Третирането с нинхидрин се използва за идентифициране на първичните и вторичните амини, за откриване на фосфатни естерни групи и др. Шиф реагента се използва за характеризиране на липидите, съдържащи алфа гликол, а дифениламиновият реагент се използва за характеризиране на гликолипидите. Фосфатидил етаноламинови фракции са събрани чрез подготвителна тънкослойна хроматография върху плочи със силикагел G

слой (*Warner-Chilcott gel*). Хлороформ-метанол-екстрактивните липиди на *E. coli* B7350 са хидролизирани с киселина, за да отделят азотните основи от фосфолипидите. Извличането и охарактеризирането на мастните киселини е получено чрез хидролиза и нагряване на изсушените клетки с азот в смес от етилов алкохол- калиев хидроксид-вода (100 ml:9 g:60 ml), при 79°C за 4 часа.

Fatty acid <sup>a</sup>	Content	
	<i>S. aureus</i> , penicillin-resistant	<i>S. aureus</i> ATCC 12600, penicillin-sensitive
	%	%
C14br	Trace	Trace
C14:0	Trace	Trace
C15br	52.6	50.7
C16br	Trace	Trace
C17br	16.5	18.1
C18:0	4.7	7.6
C19br	12.0	10.4
C20 ?	12.7	11.7

Общо съдържание на мастни киселини при

*Staphylococcus aureus*

Fatty acid <sup>a</sup>	Total fatty acids				Content					
					Fatty acids of chloroform methanol-extractable lipid					
	<i>E. coli</i> , Sc3552 (TC)	<i>E. coli</i> B7350	<i>K. pneu-</i> <i>moniae</i> G (PM)	<i>K. pneu-</i> <i>moniae</i>	<i>E. coli</i> Sc3552 (TC)	<i>E. coli</i> B7350	<i>E. coli</i> Sc8280 (TC)	<i>E. coli</i> Sc8190	<i>K. pneu-</i> <i>moniae</i> G (PH)	<i>K. pneu-</i> <i>moniae</i>
				%	%	%	%	%	%	
C8:0	0.3	0.1	0.1	0	0	0	0	0	0	0
C10:0	0.6	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0
C12:0	16.3	13.6	0.7	1.3	0.1	0.2	0.3	0	0	0
C14:0	10.4	13.7	12.7	12.2	2.0	5.4	7.8	9.8	4.3	5.7
C14:1	6.3	1.3	0.2	1.6	0	0	0	0	0	0
Peak 6	5.4	4.0	1.6	1.9	0	0	0	0	0	1.0
C16:0	21.2	21.5	38.3	20.8	47.2	44.4	56.7	56.7	51.5	42.7
C16:1	2.6	4.7	14.4	3.7	10.7	7.9	3.1	0	15.0	8.2
C17cy	9.8	10.2	5.8	9.5	20.7	23.3	17.0	25.6	9.5	24.0
C18:0	2.0	0.1	0	7.3	0	1.2	0.6	0	0	0
C18:1	1.8	1.8	12.1	4.5	13.0	8.2	8.5	1.7	15.9	7.6
C19cy	16.7	25.3	10.4	37.0	6.3	9.9	3.9	5.3	3.8	10.7
Peak 13	7.2	3.3	3.8	0	0	0	0	0	0	0
Total unsaturated acids	10.0	7.7	26.7	9.9	23.7	16.0	11.6	2.7	30.9	15.8
Total saturated acids (straight chain)	50.5	49.4	51.1	41.6	49.2	51.2	65.4	66.5	55.8	48.4
Total cyclopropane acids <sup>b</sup>	39.1	43.2	21.6	48.5	27.0	33.2	20.9	30.9	13.3	35.7

Общо количество мастни

киселини, екстрахирани при *Enterobacteriaceae*

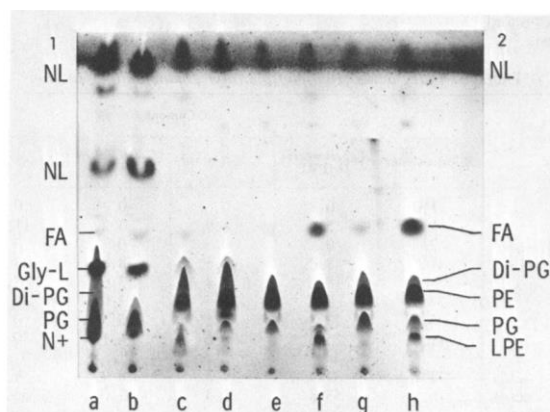


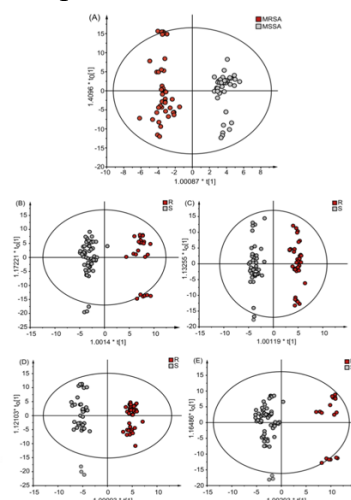
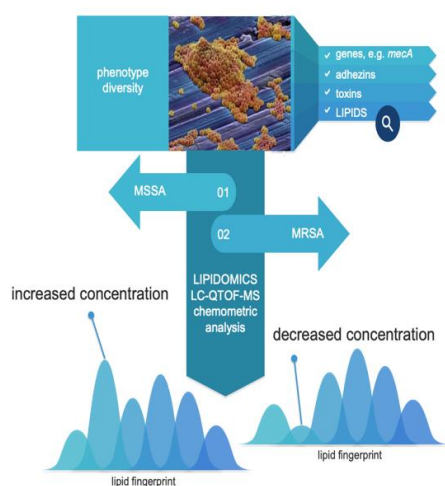
FIG. 4. Thin-layer chromatogram (Analtech TLC plate) of the FLS lipids of (a) *S. aureus* (PR), (b) *S. aureus* ATCC 12600, (c) *K. pneumoniae* G (PM), (e) *E. coli* B7350, (f) *E. coli* Sc3552 (TC), (g) *E. coli* Sc8280 (TC), and (h) *E. coli* Sc8190. Development was first in chloroform-methanol-water (65:25:4) for 10 cm and then after drying in hexane-ether (4:1) for 14 cm. The lipids were visualized by charring after treatment with 50% sulfuric acid. *S. aureus* lipids are characterized in column one, and *E. coli* and *K. pneumoniae* lipids are characterized in column two (unlabeled spots are uncharacterized lipid). The abbreviations are: LPE, lysophosphatidyl ethanolamine; PG, phosphatidyl glycerol; PE, phosphatidyl ethanolamine; Di-PG, diphosphatidyl glycerol; FA, fatty acid; NL, neutral lipid; N<sup>+</sup>, ninhydrin positive lipid; and Gly-L, glycolipid.

Тънкослойна

хроматограма на *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*

В това проучване са характеризирани липидите на бактерии, резистентни и чувствителни към антибиотици. Тъй като е добре известно, че вариациите в условията на растеж могат да повлияят на липидния състав в бактериите, са взети предварителни мерки, за да се гарантира, че бактериите от същия вид са отглеждани по същия начин. Резистентните организми са отглеждани в присъствието на антибиотик, за да се предотврати появата на мутантен антибиотик-чувствителен щам. Установено е, както е показано за общия състав на мастните киселини на *K. pneumoniae*, че съставът на мастните киселини е еднакъв независимо дали щамът се отглежда със или без антибиотик. Общите мастни киселини на *S. Aureus*, резистентни на пеницилин са сходни както качествено, така и количествено с мастните киселини на чувствителния към пеницилин щам *S. aureus*. Тази разлика в корелацията на състава на мастните киселини с антибиотична резистентност в Грам-отрицателните и Грам-положителните организми може се предполага, че се дължи на различни функции на тези липиди в тези организми. Тъй като клетките на бозайниците не съдържат циклопропанови киселини, може да се извади следният извод, че намаляването на съдържанието на циклопропан в Грам-отрицателните бактериални клетки води до мастно киселинен състав, който е по-сходен с този на еукариотните клетки, които естествено са по-устойчиви на тетрациклин и полимиксин, отколкото са бактериалните клетки. Въвеждането на ненаситена връзка или циклопропанов пръстен (особено цис конфигурация) намалява точката на топене под тази на аналогичните наситени правоверижни киселини или транс изомерите им. По този начин наличието на циклопропанови ненаситени киселини в мембранните обвивки може отчасти да бъде отговорно за естеството и целостта на тези структури и следователно може да повлияе на способността на антибиотиците да реагират или преминават през тези структури. Допълнителни проучвания биха помогнали да се изяснят ефектите на ненаситените и циклопропановите киселини върху мембранната функция. Сложните липиди на резистентните Грам-отрицателни бактерии не показват постоянна разлика в липидния състав спрямо чувствителните към антибиотиците Грам-негативни бактерии. Въпреки това, има повече FLS липиди в щам на *S. aureus*, резистентен на пеницилин, отколкото при пеницилин-чувствителен щам на *S. aureus*. Освен това резистентният щам на *S. aureus* съдържа по-голяма концентрация на липиден компонент дифосфатидил глицерол, отколкото чувствителния щам.

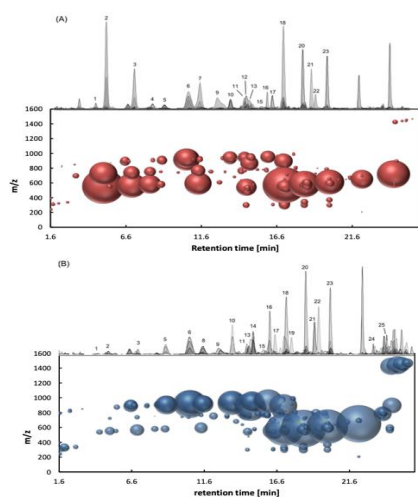
В проучване на тема „*Lipidomics of Staphylococcus aureus – a new insight into the antibiotic-resistant phenotype*“ на W. Hewelt-Belka, J. Nakonieczna, M. Belka, T. Bączek, J. Namieśnik, A. Kot-Wasik е изследван агресивния патоген *Staphylococcus aureus*, отговорен за различни заболявания, включително животозастрашаващ сепсис. Много щамове от тези бактерии са устойчиви на множество класове антибиотици, което е съществен клиничен проблем при лечението на инфекции със *S. aureus*. Разработен е изчерпателен безцелови липидомен работен протокол, включващ подготовка на проби, анализ чрез течна хроматография (LC-Q-TOF-MS) и обработка на данни, предназначени да изследват липидома на *S. aureus*. Извършено е нецелово изследване, базирано на липидомни отпечатъци (*lipidome fingerprint*), включващо анализ на четиринадесет фенотипно различни клинични изолати, за да се сравнят липидните отпечатъци на клинични изолати на *S. aureus*, които са устойчиви и чувствителни към пет антибиотика, и за извличане на информация, свързана с тяхната устойчивост към антибиотици. Към днешна дата това е първото по-ново проучване, което показва значителни разлики в липидните отпечатъци между устойчиви на антибиотици и чувствителни клинични изолати на *S. aureus*. Различията в липидния модел между чувствителните и резистентни щамове на *S. aureus* предполагат, че чувствителността към антибиотици може да бъде свързана с липидния състав на бактериалните клетки.



lipid group	retention time [min]	measured m/z
<b>PHOSPHATIDYLGlycerOLS [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup></b>		
PG (30:0)	3.3	712.5142
PG (31:0)	4.4	726.5299
PG (32:0)	5.1	740.5456
PG (33:0)	7.0	754.5612
PG (34:0)	8.2	768.5764
PG (34:0)	9.0	768.5764
PG (35:0)	11.5	782.5923
<b>LYSYL PHOSPHATIDYLGlycerOLS [M+H]<sup>+</sup></b>		
Lys-PG (30:0)	8.1	823.5820
Lys-PG (31:0)	11.1	837.5979
Lys-PG (32:0)	12.7	851.6153
Lys-PG (33:0)	14.9	865.6295
Lys-PG (34:0)	15.7	879.6449
Lys-PG (35:0)	17.1	893.6616
Lys-PG (36:0)	17.9	907.6767
<b>MONOGLYCOSYLDIACYLGlycerOLS [M+Na]<sup>+</sup></b>		
MGDG (30:0)	10.2	725.5179
MGDG (31:0)	13.2	739.5337
MGDG (32:0)	14.3	753.5505
MGDG (32:0)	14.7	753.5502
MGDG (33:0)	16.0	767.5661
MGDG (34:0)	17.0	781.5814
MGDG (34:0)	16.7	781.5812
MGDG (35:0)	17.9	795.5978

Table 1. Phosphatidylglycerols (PGs), lysylated-phosphatidylglycerols (Lys-PGs) and monoglycosyldiacylglycerols (MGDGs) identified with the novel *S. aureus* lipid database search (based on accurate mass measurement) and confirmed with MS/MS experiments.

Схематично представен процеса на липидомния анализ при *Staphylococcus aureus*, резултатите от маспектрометрията и хроматографията и видовете липиди, които са изолирани



Хроматограми на липидните отпечатъци



В заключение на това проучване би могло да се каже, че разработената цялостна методология за липидомиката на *S. aureus* е мощен инструмент, който дава представа за разликите в бактериалния липиден състав. Едноетапната аналитична процедура, която позволява едновременното разделяне, откриване и идентифициране на основните липидни групи на *S. aureus*, е голямо предимство пред широко прилаганите методи, използвани в проучванията за съдържание на липиди, базирани на TLC и GC техники. Техническата акуратност, чувствителност и потенциал на тази методология позволява да се открият основните липидни класове на *S. aureus* с висока точност (повече от 85% MFs с площ на пика % RSD под 30%). Тази методология за липидомика на *S. aureus*, позволява сравняване на липидните отпечатъци на клинични изолати *S. aureus*, които са резистентни или чувствителни към пет антибиотика: метицилин, гентамицин, ципрофлоксацин, фузидова киселина и еритромицин. Хемометричните и статистическите анализи на получените липидни отпечатъци разкриват вариации в няколко липидни групи между щамове *S. aureus*, резистентни и чувствителни към тестваните антибиотици. Установено е, че нивата на идентифицирани моноглицериддиацилглицерол, фосфатидилглицерол и диглицериддиацилглицерол липидни групи са с увеличена концентрация при резистентни щамове *S. aureus*, докато нивата на диацилглицерол липидни групи са понижени. Липидите, за които е установено, че се различават значително между устойчиви на антибиотици и чувствителни към антибиотици клинични изолати, участват в биосинтеза на основните липиди на мембранната обвивка на *S. aureus* и липотейхоевата киселина.

#### **Клинични проучвания и заболявания:**

Липидомиката може да играе ключова роля и в клиничните проучвания, прогнозирането на риска и терапевтичното проследяване на заболявания, свързани с метаболитния синдром, като се има предвид тясното свързване на липидите с тези заболявания. Липидомиката отдавна се използва за изследване на диабета и затлъстяването. Липидомиката на плазмените и липопротеиновите фракции е дала представа за сложността на липопротеините с висока плътност (HDL), разкрила е противоречията около HDL-базираните терапии за намаляване на съдовата болест, и е идентифицирала фосфолипидите като основен биоактивен компонент на HDL. Прилагането на липидомиката при изследвания на съдовото здраве и исхемичната болест на сърцето показва ефективността си и при профилиране на населението, определяне на патогенезата, идентифициране на биомаркерите и проследяване на терапевтичните отговори чрез цялостен и систематичен количествен анализ на множество липидни класове, включително окислени липиди.

Мозъкът съдържа най-голямо количество липиди. Естествено, неврологичните заболявания са свързани с нарушения в липидната сигнализация, липиден метаболизъм, транспорт и хомеостаза. Липидомиката може да се използва за изследване на тези аспекти и за разработване на биомаркери за ранна диагностика и прогноза на тези нарушения. Някои неотдавнашни представителни проучвания за неврологични заболявания и количественото изследване на липидния профил са публикувани в научната литература.

Липидите играят много ключови роли във всички основни процеси, които са от съществено значение за развитието на туморите. Например, липидите играят роля в клетъчния растеж и обмяната на веществата, които са от съществено значение за бързото разпространение на раковите клетки: неестерифицираните мастни киселини са основните градивни елементи за липидна биосинтеза и ремоделирането; холестеролът, фосфолипидите и сфинголипидите представляват основните структурни компоненти на

клетъчните мембрани; а триглицеридите служат като склад за съхранение на енергия, който, заедно с ацил CoA и ацилкарнитин, участват в обмена на енергия.

Биоактивните липиди, като лизофосфолипидите, играят важна роля в сигнализирането, функционирането като втори медиатори и като хормони в раковите клетки за насърчаване на клетъчната пролиферация, оцеляване и миграция. По същия начин продуктите от хидролизата на фосфатидилинозитол и неговите фосфорилирани производни са втори трансмитери, които активират сигналния път PI3K/AKT. Значението на този път при химиотерапията и лъчетерапията на ракови заболявания е добре призната. Не е изненадващо, че раковите клетки претърпяват дълбоки промени в липидния метаболизъм и хомеостазата, като по този начин „осигуряват“ нови диагностични и терапевтични предизвикателства, които могат да бъдат разкрити от липидомиката. Телесните течности служат като източник на биомаркери за ранна диагностика на рак, тъй като техните липидни профили отразяват общото състояние на целия организъм. В допълнение към идентифицирането на биомаркери, качествена и количествена оценка на липидите в кръвта и други телесни течности също могат да бъдат полезни за проследяване на ефикасността и токсичността на противораковото лечение.

Липидомиката дава възможност за анализ на липидите в изследването на зрението и офталмологията за разбиране и диагностициране на очни заболявания. Липидомиката е дала представа за стабилността на филма, образуван от сълзите и биомаркери за диагностика, прогноза и лечение на заболявания на очната ретина. Липидомиката също така дава възможност на ефективна липидна терапия за повлияване на възпаление на очната повърхност.

Липидомиката осигурява изчерпателен поглед върху липидите при храненето, но нейното практическо приложение чрез интервенции в хранителната диета все още е в ранен етап на развитие. Липидомиката може да се използва ефективно в изследвания върху храненето. Липидомиката може да се използва и в изследването на храненето, за да се определят функциите на липидите като сигнализиращи молекули, хранителни сензори и междинни метаболитни пътища, както и за изясняване на взаимодействията между хранителните вещества и човешкия метаболизъм. Освен това липидомиката може да оцени хранителния прием по по-стандартизиран и прецизен начин за наблюдение на острите, средносрочните и хроничните ефекти на хранителните вещества и така могат да бъдат предприети определени хранителни режими, за да се гарантира оптималния жизнен статус и доброто здраве. Липидомиката предоставя информация за молекулярния механизъм в основата на здравните ползи от омега-3 полиненаситените мастни киселини (PUFA) и регулаторната роля на омега-3 и -6 мастни киселини във възпалителния отговор.

Липидомиката осигурява нови прозрения във фармацевтичните изследвания чрез прилагане на липидомика при откриването на активни вещества, скрининг, оценка на токсичността, предклинични тестове, предвиждане и наблюдение на отговора и персонализираната медицина. Липидомиката може да се използва за изследване на голямо разнообразие от кандидат- противоракови лекарства за тези, които инхибират *de novo* липидния синтез и за идентифициране на нови биомаркери за лекарствена ефикасност.

Нова насока за омикс технологиите в биомедицинските науки е прекласификацията на болестите от молекулярна гледна точка. Сложността на здравето и болестите изисква мулти-омикс подход, като всяко отделно направление допълва и надгражда информацията, предоставена от другите, за да се разбере биологията на цялата система. Новите биомаркери могат да подобрят стратификацията на риска и подобър терапевтичен отговор, да позволят развитието на следващото поколение

терапевтични средства и да помогнат при прогнозирането и проследяването на ефикасността на лечението и реакцията към терапевтичните мерки.

### **Обобщение на състоянието на текущите знания: предимства и ограничения**

От появата на липидомика през 2003 г. напредналите аналитични технологии значително са довели полето до всички биологични и биомедицински области. Тези технологии включват методи за мека йонизация и други техники (например йонна мобилност) в маспектрометрията, науката за разделяне като ултра ефективни LC и наноматериали, анализ на директна инфузия (напр. липидомика и изображения на MS) и нови биоинформатични стратегии и библиотеки. Липидомика позволява да идентифицираме нови сигнализиращи молекули, да разкрием основните механизми, отговорни за патолофизиологичните състояния, да открием потенциални биомаркери за ранна диагностика и прогноза за болестите, целите на лекарствата и/или ефикасността им, дава насоки за подобряване на хранителните навици и диетиката и постигане на добра персонализирана медицина. Тези постижения се дължат не само на развитието на техниката, но и на естеството на липидомика в това да могат да анализират стотици до хиляди липидни видове при сегашното си развитие и да изучават липидния метаболизъм.

Независимо от огромния напредък, постигнат през последните години, някои области на технологичен напредък все още са в по-начален етап. Първо, все още се обсъжда дали отделните видове липиди могат да бъдат точно определени с настоящите методи. Понастоящем идентифицирането и количественото определяне на отделните сигнализиращи видове липиди, включително хирални изомери за ейкозаноиди, позиционни изомери на полифосфоинозити, фосфолипиди, носещи модифицирани мастни киселини, разнообразие от сфингоиди и многобройни междинни метаболити, все още не са напълно постижими. В допълнение, покритието на целия клетъчен липидом все още е мит. Нещо повече, биоинформатиката за интерпретиране на големи набори от данни е до голяма степен ограничена до нивата на липидните класове за изграждане на метаболитни пътища и мрежа. В момента достъпът до нивата на отделните липидни видове в процеса на картографиране остава проблемен. И накрая, окончателното разкриване на биохимичните механизми, отговорни за състоянието на заболяването и инфекцията, все още е рядко. Съответно са необходими големи усилия за всички тези области.

Липидомика, на сегашния си етап, е разработена в две посоки: или целеви, или глобален/машабен анализ. Първият се използва най-вече за изучаване на обработката на сигнали, докато последният е много подходящ за изучаване на липидния метаболизъм, молекулярните механизми и откритие на биомаркери. Колкото по-широко е покритието на тази методология, толкова по-добре може да се картографират всички метаболитни пътища на липидните класове/подкласовете и отделните видове на дадена система и да се разбере по-добре взаимовръзката между тези класове и видове в метаболитния път или между метаболитните мрежи. Вече е доказана ползата и потенциала на биоинформатиката за тълкуване на данни въз основа на маспектрална симулация или динамично моделиране или пък данни от геномни анализи. Въпреки това, тези успехи са само в изолирани проучвания. С напредването на технологиите за липидомика, преплитането на тази дисциплина с други области става задължително. Интегрирането на липидомика с други стратегии на омикс технологиите може да увеличи потенциала на липидомика за разбиране на молекулярните механизми, които са в основата на болестите. По този начин, в допълнение към разширяването на обхвата на липидния анализ, една от логическите бъдещи посоки в областта трябва да бъде интегрирането на

данни от липидомиката с генетични, транскрипционни и ензимни данни за извършване на широкообхватни метаболитни анализи. Предвид структурното разнообразие на липидните класове и видове, тези задачи са предизвикателни и изискват комбинация от нови и съществуващи биоинформатични ресурси.

*“Lipidomics is a big field because changes of the lipid profile are related to the disease state or different stages of cells, so this is an important tool for either diagnostics or for systems biology”* - Yu Xia, associate professor in Purdue’s Department of Chemistry ([https://engineering.purdue.edu/discovery/2016\\_2/new-lipidomics-method-could-bring-fast-cancer-diagnosis](https://engineering.purdue.edu/discovery/2016_2/new-lipidomics-method-could-bring-fast-cancer-diagnosis) )

"Липидомиката е голямо поле, защото промените в липидния профил са свързани с болестното състояние или различните стадии на клетките, така че това е важен инструмент за диагностика, или за системна биология", казва Ю Ся, доцент в университета "Пурдуй".

За по-нататъшно разработване на диагностични инструменти, лекарства за превенция и създаване на терапевтични лекарства, е необходимо по-добро разбиране на липидите в целия организъм. Посочените по-долу препоръки са насочени към необходимостта от ускоряване на научните изследвания в областта на структурната медицина в Европа със специален акцент върху липидомиката.

#### **Препоръка: Инвестиране в човешки експертен потенциал:**

Възможностите на липидните изследвания и омикс науките в рамките на структурната медицина могат да се реализират само когато има достатъчно експертен потенциал и подготвени учени, като това може да бъде постигнато чрез инвестиции в адекватни интердисциплинарни, образователни програми за обучение и научни изследвания. Голямо разнообразие от дисциплини, концентрирани в области като химията, биологията и физиката трябва да се преподават в обучителни програми, специализирани докторски и MD/PhD програми и научни изследователски програми. Основна цел в бъдеще ще бъде разработването на технологии, позволяващи разширяване на знанията, данните и проучванията. Една от най-важните методологии ще бъде маспектрометрията, необходима да се направи количествен анализ на липидомиката. Подобряването на техниките за анализ на липида, т.е. подготовка на проби, липиден синтез, аналитични техники и биоинформатични методи изискват разработването на стандартни процедури за работа и стандартни процедури за обработка. Едно от направленията, по които вече се работи, с цел подкрепа и обмяна на опит между експерти и учени от различни направления е наскоро създадената „Lipidomics Expertise Platform“, форум за обмен на информация, стандартни оперативни процедури и данни от проучвания в Европа.

#### **Препоръка: Интегриране и свързване на липидомиката с бази данни**

Ключова задача за бързо развитие на липидомиката ще бъде изграждането на обща, отворена за достъп база данни на научните колективи, които работят или ще работят в това направление, с цел обмяна на опит и данни като: липидни видове, картографирани липидни класове, както и данни, които са свързани с генома, протеома, метаболома и липидите. Такава база данни следва да предоставя среда за споделяне и обмяна на информация за биоинформатични инструменти, които позволяват да се

интегрира цялата химична, физична, биологична и медицинска информация, свързана с липидите. Освен това, интегративната база данни е предпоставка за изготвяне на стратегии, засягащи регулирането на липидния метаболизъм и респективно за борба с инфекциозни и други заболявания. Това от своя страна ще помогне да се открият нови липидни биомаркери или патомеханизми и да се използват тези знания за диагностика, мониторинг и лечение на липидом-свързани заболявания.

### **Препоръка: Хармонизиране на липидомните практики в рамките на ЕС**

Стандартизацията на липидомиката е наложително да се случи в даден по-напреднал етап от развитието на тази технология. Строго препоръчителна е междудисциплинарна колаборация между институции, научни звена, академични структури и производство на регионално, национално и на европейско ниво за разбиране, развитие, усъвършенстване на липидомната техника и оценка на ролята на омикс технологиите в здравеопазването и добрата диагностична практика.

### **Използвана литература:**

- <http://www.lipidomics-expertise.de/ELEPPublic/misc/Links.jsp>
- [https://engineering.purdue.edu/discovery/2016\\_2/new-lipidomics-method-could-bring-fast-cancer-diagnosis](https://engineering.purdue.edu/discovery/2016_2/new-lipidomics-method-could-bring-fast-cancer-diagnosis)
- Host-Pathogen metabolomics of *Pseudomonas aeruginosa* infection models - Michael Witting
- Correlation of Bacterial Lipid Composition with Antibiotic Resistance - JUNE K. DUNNICK AND WILLIAM M. O'LEARY
- Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay- E.A. Idelevich, K. Sparbier, M. Kostrzewa, K. Becker
- Direct Antimicrobial Resistance Prediction from MALDI-TOF mass spectra profile in clinical isolates through Machine Learning - Caroline Weis, Aline Cuénod, Bastian Rieck, Felipe Llinares-López, Olivier Dubuis, Susanne Graf, Claudia Lang, Michael Oberle, Kirstine K. Soegaard, Michael Osthoff, Karsten Borgwardt, Adrian Egli
- Dortet, L., Potron, A., Bonnin, R. A., Plesiat, P., Naas, T., Filloux, A., et al. (2018b). Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria. *Sci. Rep.* 8:16910. doi: 10. 1038/s41598- 018-35041- y
- MALDI-TOF MS APPLICATION FOR SUSCEPTIBILITY TESTING OF MICROORGANISMS Editors: Karsten Becker, University Medicine Greifswald, Germany Sören Schubert, Ludwig Maximilian University of Munich, Germany
- Untargeted Lipidomics Reveals Differences in the Lipid Pattern among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Resistant and Sensitive to Antibiotics – Weronika Hewelt Belka, Joanna Nakonieczna, Mariusz Belka, Tomasz Bączek, Jacek Namiesnik, and Agata Kot-Wasik
- MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives - Georgia Vrioni, Constantinos Tsiamis, George Oikonomidis, Kalliopi Theodoridou, Violeta Kapsimali, Athanasios Tsakris

- Bacterial lipid membranes as promising targets to fight antimicrobial resistance, molecular foundations and illustration through the renewal of aminoglycoside antibiotics and emergence of amphiphilic aminoglycosides - Marie-Paule Mingeot-Leclercq and Jean-Luc Décout
- Structural Medicine II: The Importance of Lipidomics for Health and Disease - European Science Foundation (ESF)
- [https://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics#Structural\\_diversity\\_of\\_lipids](https://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics#Structural_diversity_of_lipids)
- <https://www.lipotype.com/>
- Lipidomics: Techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences - Kui Yang and Xianlin Han
- Lipidomics of *Staphylococcus aureus* – a new insight into the antibiotic-resistant phenotype. W. Hewelt-Belka, J. Nakonieczna, M. Belka, T. Bączek, J. Namieśnik, A. Kot-Wasik
- The clue is in the lipid A: Rapid detection of colistin resistance - R. Christopher D. Furniss, Markus Kostrzewa, Despoina A. I. Mavridou, Gerald Larrouy-Maumus
- Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria - Laurent Dortet, Anais Potron, Rémy A. Bonnin, Patrick Plesiat, Thierry Naas, Alain Filloux & Gerald Larrouy-Maumus
- Screening of biomarkers of drug resistance or virulence in eScApe pathogens by MALDI-tof mass spectrometry - Samantha flores-treviño, Elvira Garza-González, Soraya Mendoza-olazarán, Rayo Morfín-otero, Adrián camacho-ortiz, Eduardo Rodríguez-noriega, Adrián Martínez-Meléndez & paola Bocanegra-ibarias
- Lipid oligonucleotides as a new strategy for tackling the antibiotic resistance - tina Kauss, corinne Arpin, Léa Bientz, phouc Vinh nguyen, Brune Vialet, Sebastien Benizri & philippe Barthélémy
- Proof-of-principle antimicrobial resistance routine diagnostics surveillance project (PoP project) - WHO

#### **Изготвил:**

Красимира Захаријева  
 Главен експерт в Дирекция ОРХВ към ЦОРХВ