

Lipit Araştırmalarının Geçmişi ve Geldiği Son Nokta: Lipidomik Araştırma Teknikleri

Esin Öz¹

Ahmet Yalçınkaya²

Yeşim Öztaş³

Özet

Lipitler, suda çözünmeyen, inorganik çözücülerde çözünen biyomoleküllere verilen ortak isimdir. Bu tanımlamanın bir sonucu olarak moleküler yapı ve fonksiyon açısından en geniş çeşitliliğe sahip bileşiklerdir. 2003 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) desteğiyle çok merkezli bir araştırma konsorsiyumu olarak kurulmuş olan Lipid Metabolites And Pathways Strategy yeni lipitlerin tanımlanması ve kantifikasyonuna önemli katkılar vermiştir. Günümüzde, bir hücre, doku, organ veya organizmanın yapısında yer alan tüm lipitleri ifade etmek için **lipidom** terimi kullanılmaktadır. Lipidomik ise hücre, doku, organ veya organizmaya ait lipidomu geniş ölçekli olarak araştıran ve lipit metabolizmasındaki tepkime yolaklarını açığa çıkarmak üzere gelişen bir bilim dalıdır. İlk kez 2003 yılında literatüre giren lipidomik metabolomiğin bir alt alanı gibi görülmüşse de yıllar içinde lipit biyolojisi, biyokimya, analitik kimya, biyoinformatik, fizyoloji ve tıbbi bir araya getiren ve literatürdeki yayın sayısının hızla arttığı ayrı bir bilim dalı olarak kabul görmeye başlamıştır. Lipidomik araştırmalarla farklı yapısal özellikleri ortaya çıkarılan lipitlerin, birçok biyolojik süreçte yer aldığı ve tip 2 diyabet, obezite, non-alkolik karaciğer yağlanması, Alzheimer hastalığı ve kanser gibi birçok yaygın hastalığın etiolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir. Hem temel hem de klinik biyokimya araştırmacıları, gelişmekte olan bu alanla ilgili yenilikleri takip etmek ve sağlık bilimleri alanındaki potansiyel katkısının farkında olmak zorundadır.

- 1 Kimyager, Doktora Öğrencisi, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0002-0074-9471, esinoz23@gmail.com
- 2 Tıp Doktoru, Bilim Doktoru (PhD), Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0002-1172-3330, ahmety38@gmail.com
- 3 Tıp Doktoru, Bilim Doktoru (PhD), Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0002-8638-9744, yesimeroztas@gmail.com

GİRİŐ

Lipitler, suda çözünmeyen, inorganik çözücülerde çözünen biyomoleküllere verilen ortak isimdir. Bu tanımlamanın bir sonucu olarak moleküler yapı ve fonksiyon açısından en geniş çeşitliliğe sahip bileşiklerdir. Lipitler, hücre zarı ve kan dolaşımındaki lipit partikülleri (lipoprotein ve eksozomlar) gibi bileşenlerin yapısında yer alır. Bunun yanında metabolizmada çeşitli sinyal yollarında görev alarak hücrenel transport, protein trafığı, büyüme, farklılaşma ve enerji depolama gibi hayati işlevleri gerçekleştirirler. Őimdiye kadar bilinen bu özellikleri dışında lipitlerin her geçen gün yeni rolleri keşfedilmektedir (1).

2003 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) desteğiyle çok merkezli bir araştırma konsorsiyumu olarak kurulmuş olan Lipid Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS®) yeni lipitlerin tanımlanması ve kantifikasyonuna önemli katkılar vermiştir. Konsorsiyumun 2005 yılında önerdiği lipit sınıflama ve isimlendirme sistemi (LIPID MAPS Lipid Classification System, LMLCS) uluslararası kabul görmüş, 2009’ da güncellenmiş ve günümüzde başta biyoinformatik analizlerde olmak üzere sıklıkla kullanılmaktadır.

LMLCS’e göre lipit molekülleri; yağ asitleri, gliserolipitler, gliserofosfolipitler, sfingolipitler, sterol lipitler, prenol lipitler, sakkarolipitler ve poliketidlerden oluşan sekiz sınıfa ayrılmıştır (2). Bu grupların çoğu lipitlerle ilgilenen araştırmacılar için tanıdık olsa da bazı grupları hatırlatmak önemli olabilir. Örneğin, sakkarolipitler, yağ asitlerinin direkt şeker gövdesine bağlanmasıyla oluşan membran yapısına girebilen bileşiklerdir. Yapılarında gliserol yerine monosakkarit bulunur. Poliketidler ise asetil ve propiyonil altbirimlerinin yağ asidi sentaza benzeyen enzimler ile polimerizasyonu sonucu sentezlenirler. Bu gruplar içerisinde en az tanınırlık poliketidler için olsa da sık kullanılan eritromisin, tetrasiklin, ivermektin, efotilon gibi antimikrobiyal, antiparazitik ve antikanser ajanlar poliketid türevleridir.

Her bir gruptaki lipit molekülleri için yapısal çeşitliliğin bir sonucu olarak binlerce farklı lipit izoformu bulunur. Bu yapısal çeşitliliğe en büyük katkıyı veren farklı zincir uzunluğu ve doymuşluk derecesine sahip yağ asitleridir. Bir biyolojik örneğin lipit türlerini saptarken, lipit ekstraksiyonu için kullanılan yöntem kadar bu ekstraktın analizinde kullanılacak yöntemler de moleküler çeşitlilikte belirleyici olmaktadır. Farklı organik çözücüler kullanarak ekstraksiyonu gerçekleştirilen lipitler, ince tabaka kromatografisi (İTK), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), kütle spektrometresi (MS), sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC- MS), nükleer manyetik

rezonans (NMR) spektroskopisi gibi tekniklerle kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilir.

Günümüzde, bir hücre, doku, organ veya organizmanın yapısında yer alan tüm lipitleri ifade etmek için **lipidom** terimi kullanılmaktadır. Lipidomik ise hücre, doku, organ veya organizmaya ait lipidomu geniş ölçekli olarak araştıran ve lipit metabolizmasındaki tepkime yollarını açığa çıkarmak üzere gelişen bir bilim dalıdır. İlk kez 2003 yılında literatüre giren (3) lipidomik metabolomiğin bir alt alanı gibi görülmüşse de yıllar içinde lipit biyolojisi, biyokimya, analitik kimya, biyoinformatik, fizyoloji ve tıbbi bir araya getiren ve literatürdeki yayın sayısının hızla arttığı (Şekil 1) ayrı bir bilim dalı olarak kabul görmeye başlamıştır (4). Lipidomik araştırmalarla farklı yapısal özellikleri ortaya çıkarılan lipitlerin, birçok biyolojik süreçte yer aldığı ve tip 2 diyabet, obezite, non-alkolik karaciğer yağlanması, Alzheimer hastalığı ve kanser gibi birçok yaygın hastalığın etiolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir (5).



Şekil 1. PUBMED veri tabanında 'lipidomics' kelimesiyle tarama yapıldığında, 2000-2022 yılları arasında yayınlanmış makale sayısı.

LİPİT ARAŞTIRMALARININ TARİHÇESİ

1900 öncesi lipit araştırmaları

Modern lipit kimyası çalışmaları 17. yüzyılda başlamıştır. İlk olarak lipitlerin organizmada nerede ve nasıl yer aldığına anlaşılması ve belki de daha önemlisi farklı türlerinin olduğunun gösterilmesi gerekmiştir.

Örneğin, 1665'te beslenme sonrası hayvanlardan alınan kan örneklerinin 'süt gibi' olduğu gözlenmiş, ancak bunun beslenmeye bağlı artmış yağ içeriğinden kaynaklandığı 1774 yılında anlaşılmıştır. Benzer şekilde, safra taşlarının bileşiminde sert, yağlı bir 'madde' izole edilmiş ancak bu maddenin kolesterol olduğu çok sonraları anlaşılmıştır (6). 1815'te lipitler, katı gresler / donyağı (suifler) ve sıvı yağlar (huiles) olarak iki kategoride sınıflandırılmış (7) 1823'te ise yağlar, gresler, donyağı, mumlar, reçineler ve uçucu yağlar gibi daha ayrıntılı bir sınıflandırma geliştirilmiştir. 1827'de göz kapağında yağ birikmesi 'ksantelazma' olarak tanımlanmış ve 1856'da endotel hücre hasarının aterosklerotik plak oluşumunu başlattığı öne sürülmüştür (6). Bu dönemin lipitler açısından en kritik gelişmesi ise 1854'te gliserolün yağ asitleriyle birleşmesi ile nötral lipitlerin sentezlendiğinin tespiti (mono-, di- ve trigliseritler) olmuştur.

1871'de kalp kasından kolesteril esterleri izole edilmiş (8) 1872'de sülfürik asit kullanarak safra taşlarında kolesterolü belirlemek için bir yöntem geliştirilmiş, 1885'te kloroformlu sülfürik ve asetik asit kullanılan bir ekstraksiyon yöntemi (9) ile kolesterol düzeyleri ölçülmüştür (10). Liebermann-Burchard reaksiyonu olarak bilinen bu prosedür, kloroform yerine asetik anhidrit kullanılması dışında, Amerikan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından günümüzde halen yararlanılan bir yöntemdir (11).

20. yüzyıl başlarında lipit araştırmaları

1900'den 1950'ye kadar, lipit kimyası yavaş da olsa önemli ilerlemeler kat etmiştir. 1901'de kan dolaşımdaki lipitlerin, proteinelere bağlı olarak taşındığı keşfedilmiş (12). 1913'te tavşanlara kolesterol verilmesiyle ateroskleroz geliştiği gösterilmiştir (13). Lipitlerde üzerinden ulaşılan bu gibi keşiflerin de desteğiyle, 1918 yılında miyokard enfarktüslerinin her zaman ölümcül olmadığı ve sanılandan daha yaygın olduğu fark edilmiştir (14).

1924'te yağlı bir öğünden sonra kanda gözlemlenen büyük partiküllere, şilomikron adı verilmiştir (15). 1925'te genel grup adı olarak "Lipitler" teriminin kullanılması önerilmiş ve ilk bilimsel temelli lipit sınıflandırması öne sürülmüştür. Lipitlerin fonksiyonel rolleri olduğu da bu dönemde anlaşılmaya başlanmıştır. Örneğin, Gorter ve arkadaşları kırmızı kan hücrelerinin gliserofosfolipit tabakasıyla çevrelendiğini göstererek hücre zarının lipit çift tabakadan oluştuğunu ileri sürdüler (16). 1929'da at serumundan lipoproteinler izole edildi ve daha sonra yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) adını alacak olan bir α -globulin ökeltildi. 1930'larda diyetle alım ile hücre içi kolesterol sentezi arasında bir denge olduğu öne sürüldü ve ailesel hiperkolesterolemi tanımlandı (17).

Laboratuvar yöntemleri açısından baktığımızda, 1920'ler ve 1930'larda lipoproteinlerin incelenmesi için kullanılacak olan çeşitli laboratuvar tekniklerinin geliştirildiği ve bu yöntemlerin ilerideki gelişmelere önemli katkılar sunduğunu görebiliriz. 1940'larda John Gofman'ın ekibi, ultrasantrifüjleme ile lipoproteinleri izole etmiş ve α - ve β -lipoproteinlerde farklı türlerin olduğunu göstermişlerdir. Neticede bu yapıların adlandırılması, lipoproteinlerin izole edildiği farklı yoğunluk santrifüj bölgelerini yansıtmak için, çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve HDL olarak son halini almıştır (18). 1947'de Vartiainen, Avrupa'da ateroskleroz insidansının II. Dünya Savaşı'nın sürdüğü yıllarda azaldığını ve dolayısıyla diyetdeki değişikliklerle ilgili olduğunu bildirdi (19). Bu gözlem, kolesterol ve ateroskleroz arasındaki ilişkinin tedavi edilebilir ve geri döndürülebilir olduğunun ilk kanıtıydı. Günümüzde 'Klinik Lipidolojinin Kurucusu' olarak anılan Gofman, 1950'lerde kalp hastalıklarıyla ilgili geniş katımlı klinik araştırmaları başlattı.

Lipit alanındaki araştırmaların önem kazanmasıyla 1947 yılında Amerikan Yağ Kimyacıları Derneği (AOCS) '*Lipids*' ve Amerikan Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Derneği de 1959 yılında '*Journal of Lipid Research*' dergilerini yayınlamaya başladı. Bu dergiler günümüzde de en prestijli lipit dergileri arasında yer almaktadır. Bu yayınların etkisi ve teknolojik gelişmeler sayesinde ilerleyen yıllarda artan çalışmalar ile lipitlerin yapısının anlaşılması ve fizyolojik rollerinin açığa çıkarılmasında önemli aşamalar kaydedildi. Örneğin, 1970'ler ve 1980'lerde düz ve ters fazlı HPLC sistemi ile fosfolipit türleri ve izomerleri, kimyasal olarak saflaştırılmış ve bileşenlerine ayrılabilmiştir. Bu ilerlemelere paralel olarak, Lynen ve Konrad, aterosklerozun ve kalp hastalıklarının gelişiminde kolesterolün anahtar rolünü ortaya koydukları çalışmalarıyla 1964 Fizyoloji-Tıp Nobel Ödülünü aldılar. Bergström ve Samuelsson prostoglandinlerin yapısını açığa çıkaran araştırmalarıyla 1982 yılında Nobel Ödülünü, prostasiklinin ve aspirinin prostaglandin üretimini baskıladığını keşfeden Vane ile paylaştılar. Lipit alanıyla ilgili tüm Nobel Ödülleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1 Lipit Biyokimyasının gelişimine katkıda bulunmuş araştırmalara verilen Nobel dlleri (20)

Yıl	Alan (Fizyoloji-Tıp veya Kimya)	Araştırma konusu	Araştırmacılar
1928	Kimya	Sterollerin yapısı ve vitaminlerle olan bağlantıları	Adolf Otto Reinhold Windaus
1950	Fizyoloji-Tıp	Adrenal korteks hormonlarının yapıları ve biyolojik etkileri	Philip Showalter Hench Edward Calvin Kendall Thadeus Reichstein
1953	Fizyoloji-Tıp	Koenzim A'nın keşfi ve ara metabolizmadaki nemi	Fritz Albert Lipmann
1955	Fizyoloji-Tıp	Oksidasyon enzimlerinin etki mekanizması ve yapısı	Axel Hugo Theodor Theorell
1964	Fizyoloji-Tıp	Yağ asidi metabolizması ve kolesterol regülasyonu ve mekanizması	Konrad Bloch Feodor Lynen
1982	Fizyoloji-Tıp	Prostaglandinler ve ilişkili biyolojik aktif maddeler	Sune K. Bergström Bengt Samuelsson. John Robert Vane
1985	Fizyoloji-Tıp	Kolesterol metabolizmasının regülasyonu	Michael S. Brown and Joseph L. Goldstein
2002	Kimya	Biyolojik makromoleküllerin tanımlanması ve yapı analizi	John B. Fenn and Koichi Tanaka
2003	Fizyoloji-Tıp	Manyetik rezonans görüntüleme (MR) keşfi	Paul Lauterbur Sir Peter Mansfield
2013	Fizyoloji-Tıp	Hcrelerimizdeki majör iletim sistemi olan vezikül trafiğinin işleyişinin düzenlenmesi	James E. Rothman Randy W. Schekman Thomas C. Sdhof
2016	Fizyoloji-Tıp	Otofaji mekanizması	Yoshinori Ohsumi
2017	Kimya	zeltideki biyomoleküllerin yüksek znrlkl yapı tayini için kriyo-elektron mikroskopunun geliştirilmesi	Jacques Dubochet, Joachim Frank Richard Henderson

1986'da sfingozinin protein kinaz C'yi inhibe ettiğinin gösterilmesiyle bu lipidin sinyal iletiminin regülasyonunda görev aldığı fikri ortaya atıldı (21). Bütün bu gelişmelerle birlikte lipidlerin fizyolojik görevlerinin aydınlatılması yönelik çalışmalar 21. yüzyılın başlarında büyük bir hız kazandı. Omega-3 ve omega-6 yağ asidi biyosentezini artıran spesifik bir yağ asidi desatüraz haplotipinin, koroner arter hastalığı ile ilişkili olabileceği sonucuna varıldı (22). Mikrobiyota tarafından fermantasyonla üretilen kısa zincirli yağ asitlerinin, beyin mikroglia homeostazının düzenlenmesinde etkisi olduğu belirlendi (23).

Lipit analizlerinde ilk kez 1991'de kütle spektrometrisi kullanılmış, trombosit aktive edici faktör ve diaçilgliserol elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI/MS) ile analiz edilmiştir. 1994 yılında Han ve Gross, ESI/MS yöntemini geliştirerek lipidomik amaçlı kullanımının ilerlemesini sağlamışlardır (3). Zaman içinde Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon / İyonlaştırma (MALDI)-MS ve ESI-MS yöntemlerinin daha da geliştirilmesi ile lipid moleküllerinin detaylı analizinin önü açılmıştır (24).

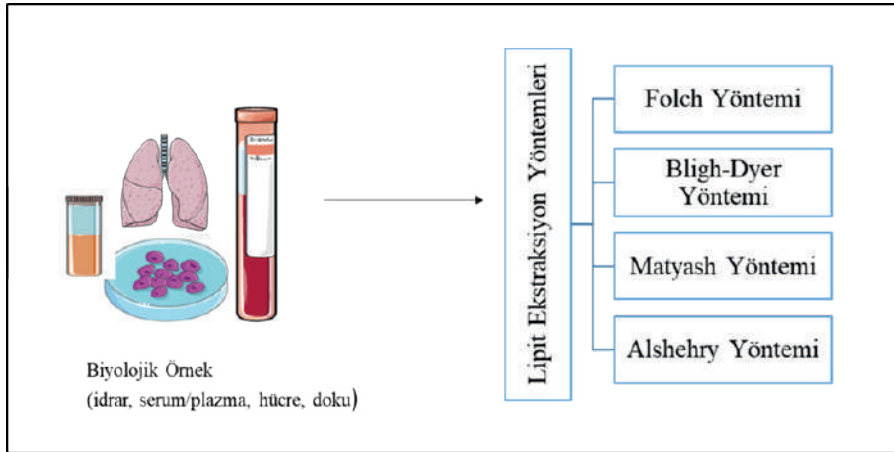
Lipidomik yaklaşım kullanılarak, sfingolipit türleri, özellikle d16:1 (sfingozin) ve d18:2 (sfingadienin) yüksekliği ile obezite ve tip 2 diyabet arasında ilişkiler tespit edildi (25). Galaktozile kolesterolün varlığı ilk kez sıçan beyinde gösterilerek metabolizması açıklandı (26). Bu ilerlemeler ve gelişen metabolik anlayışlar sayesinde vücutta fonksiyonel ve düzenleyici rolleri olan geniş lipid grubu tanımlanmaya başlandı. 'Biyoaktif lipidler' denen bu moleküllerin hastalık patolojisi ile ilişkileri yanında, hücre/doku düzeyinde kesin etkileri gösterilmiş olan bazı lipidler ayrıntılı araştırmaların konusu oldu (oksilipinler, diaçilgliseroller, seramidler, sfingozin-fosfat türevleri, oksisteroller, eikozanoidler vb). Biyoaktif lipidlerin yapısal çeşitliliği ve fonksiyon gösterme şekilleri çok büyük değişkenlik gösterebildiğinden bunların görevlerini anlatmak başka bir derlemenin konusudur; ancak literatürde bilinen mekanizmalar ve çeşitli ilişkiler açıklanmıştır (27).

Yakın zamanda yayınlanan AdipoAtlas çalışmasında insan beyaz yağ dokusunun ayrıntılı lipidomik profillemesi yapılmıştır (28). Bu çalışmada hem polar hem de nonpolar lipidleri kapsayacak şekilde optimize edilmiş lipid ekstraksiyonu ve fraksiyonlama ile üç ayrı sıvı kromatografi sistemi ve de yüksek rezolüsyonlu ardışık MS kullanılarak 1600'den fazla lipid türü kantitatif olarak ölçülebilmektedir.

LİPİT ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Lipit Ekstraksiyonu

Lipitlerin verimli bir şekilde izole edilmesi, geri kazanılması ve ekstrakte edildikleri biyolojik matristen sinyal girişimini azaltması için özel lipit ekstraksiyon yöntemlerine ihtiyaç vardır (Şekil 2). Suda çözünmedikleri için lipitleri ayırmada organik çözücüler kullanılır. Nötral lipitler; etil eter, kloroform ve benzen ile çözünürken, zar lipitleri ise etanol, metanol gibi daha polar organik çözücülerde çözünürler. Biyolojik numunelerde, pikomolardan mikromolara kadar geniş bir lipit konsantrasyon aralığı vardır (29). Bu geniş aralık, lipitlerin isabetli ölçümü ve sınıflaması için ekstraksiyon fazının önemini göstermektedir. Lipidomik analizlerde kullanılan en yaygın ekstraksiyon yöntemleri sıvı-sıvı (solvent) ekstraksiyona dayanır.

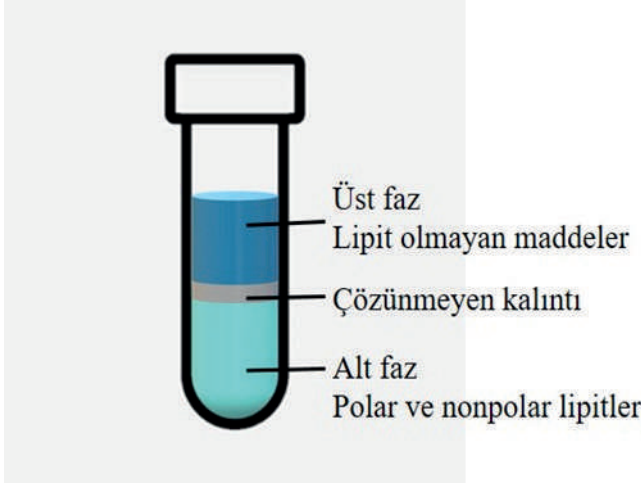


Şekil 2. Biyolojik örneklerde kullanılan lipit ekstraksiyon yöntemleri

Folch Yöntemi

İlk olarak 1957'de hayvan beyin dokusundaki lipitlerin saflaştırılması ve hazırlanması için kullanılmış olan ve en yaygın kullanılan lipit ekstraksiyon tekniğidir (30). Lipitleri ekstrakte etmek için 2:1 (v:v) oranında kloroform ve metanol karışımı kullanılmıştır. Lipit olmayan bileşenleri uzaklaştırmak için ekstraksiyon ardından küçük hacimlerde su kullanarak bir yıkama aşaması yapılabilir. Karışım beklemeye bırakıldığında iki fazlı bir sistem elde edilir. Alt faz (kloroform) tüm doku lipitlerini içerirken, üst faz (su/metanol) lipit olmayan maddeleri içerir (Şekil 3). Sonuç olarak bu ekstraksiyon yöntemi, diğer herhangi bir tek çözücü yöntemden daha yüksek verimlilik sağladığı için evrensel kabul görmüştür.

- Basittir.
- İstenilen her ölçekte uygulanabilir
- Yıkama işleminden kaynaklanan lipit kayıplarının önemli ölçüde azalır
- Köpürme ve proteolipit kaybı olmadan temiz kuru bir ekstrakt elde edilir.



Şekil 3: Folch yöntemi ile faz dağılımı

Bligh-Dyer Yöntemi

1959 yılında E.G. Bligh ve W.J. Dyer tarafından, dondurulmuş balıklarda toplam lipit içeriğini belirlemek için hızlı ama etkili bir lipit ekstraksiyon yöntemi olarak geliştirilmiştir (31). Folch yöntemi de hızlı sayılmasına rağmen, büyük hacimlerde çözücü kullanma dezavantajına sahiptir. Bu yöntemde, kloroform:metanol:su (1:1:0,5 v/v/v) içeren ekstraksiyon çözeltisi kullanılarak hücresel parçalamaya ile lipit ekstraksiyonu sağlanmaktadır. Genel olarak, katı dokudan lipitlerin ekstraksiyonu için Folch yöntemi kullanılırken, Bligh-Dyer yöntemi biyolojik sıvılar için avantajlıdır.

Önemli bir not olarak belirtilmelidir ki, Bligh-Dyer ekstraksiyon yöntemi fosfolipitleri ekstrakte etmekte uygun olmasına rağmen lizofosfatidik asit, sfingozin-1-fosfat, sülfatid gibi hidrofilik lipitleri ekstrakte edememektedir (32).

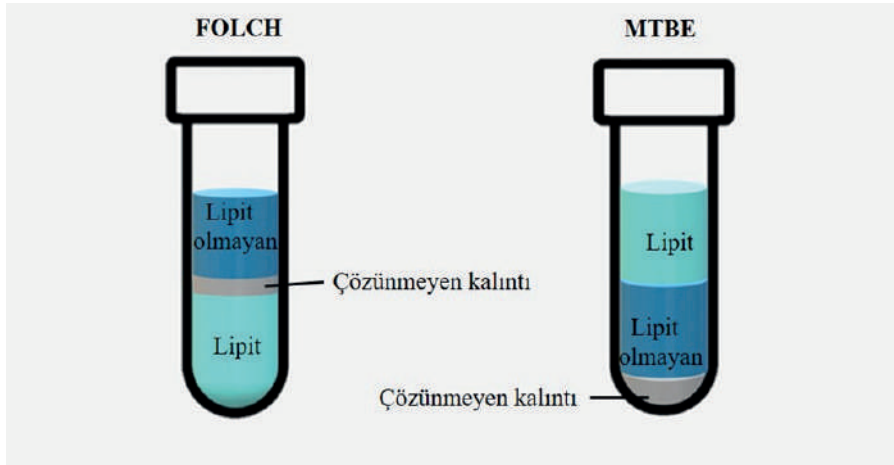
Folch ve Bligh-Dyer yöntemleri; sağlık, ilaç, gıda veya biyoyakıt laboratuvarlarında lipit analizleri için günümüzde de kullanılmaktadır. Ancak

bu yöntemlerde kullanılan kloroform, yüksek derecede toksik ve kanserojen olduğundan güvenlik açısından ciddi dezavantaj oluşturur. Folch ve Bligh-Dyer yöntemlerini iyileştirmek için, kloroform / metanol karışımı yerine daha zararsız kimyasallar denenmiş ve farklı yöntemler ortaya konmuştur.

Matyash Yöntemi

Matyash yöntemi kloroform toksisitesi riskini ortadan kaldırmak için türetilen metotlardan biridir (33). Metil tert-butil eter (MTBE) / metanol karışımı ile lipit ekstraksiyonu örnek hazırlığı aşamasını basitleştirir ve çok düşük miktarlardaki biyolojik örneklerin nispeten daha isabetli olarak ayrıştırılmasına olanak sağlar (34) ancak bunun aksine sonuçlar da bildirilmiştir (35).

Bu yöntemde, 200 mikrolitre (μ l) sıvı örneğe 1,5 mililitre(ml) metanol ilave edilir daha sonra vortekslenir. 5 ml MTBE ve 1,5 ml su ilave edilir. MTBE düşük yoğunlukta olduğu için sıvı faz ekstraksiyonu sırasında lipit içeren organik fazın st tabakada kalması sağlanmış olur (şekil 4). Folch ve Bligh-Dyer yöntemlerinde lipit içeren faz, yüksek kloroform yoğunluğu nedeniyle alt tabakayı oluşturur ve bu da lipit tabakasının toplanmasını zorlaştırabilir. Ayrıca, Folch ve Bligh-Dyer yöntemlerinde denatüre proteinler gibi ekstrakte edilemeyen matrisler st ve alt fazlar arasında iken, MTBE yönteminde ekstraksiyon tüpünün dibinde yoğun bir pelet oluşturarak santrifüjleme ile kolayca ayrılır.



şekil 4: MTBE ve Folch yöntemlerindeki faz dağılımı.

MTBE, kloroform içeren yöntemlerle karşılaştırıldığında;

- Yoğunluğu düşük olduğundan lipit içeren organik fazın üst fazda oluşmasını sağlar ve toplama işlemlerini basitleştirir.
- Toksik ve kanserojen değildir.
- Kimyasal olarak stabildir.
- Aşındırıcı özelliği yoktur.
- Saklama sırasında peroksit oluşturmaz ve bu yüzden kararsız lipitleri bozma tehlikesi taşımaz.

Alshehry Yöntemi (BUME)

2015 yılında Zahir H. Alshehry ve arkadaşları tarafından, 10 μ l plazma örneği, 100 μ l 1-bütanol:metanol (1:1 v/v) ile karıştırılarak tüm ana lipit sınıflarının (steroller, gliserolipitler, gliserofosfolipitler ve sfingolipitler) ekstraksiyonu bildirilmiştir (36). Bu yöntemin farkı 1-bütanol:metanol karışımı (1:1, BUME) ve izopropanol kullanılarak tek fazlı ayırma yöntemiyle lipit ekstraksiyonunun elde edilmesidir. Büyük ölçekli çalışmalarda tekrarlanabilirliği sağlamak için minimum örnek hazırlığı gerektirdiğinden tek fazlı yöntem avantajlıdır. Bütanol ve metanole (BUME) dayanan tek fazlı ekstraksiyon yönteminde, seramik boncuklar içeren 2 ml'lik polipropilen tüpler kullanılarak homojenizasyon sağlanmaktadır. Tek bir tüpte örnek toplama, depolama, homojenleştirme ve ekstraksiyon prosedürünün tamamını gerçekleştirebilme avantajı sağlarken, seçilen çözücüde lipit bakımından zengin üst fazı sağlamaktadır. Matyash'a kıyasla tek fazlı ekstraksiyon yönteminin verimi düşüktür. Ayrıca ekstraksiyon sonucu lipit olmayan bileşiklerin arttığı bunun da kontaminasyona ve iyon süpresyonuna neden olduğu gözlenmiştir (37).

Lipit analizlerinde **katı-faz ekstraksiyonu** da kullanımı artan bir uygulama olarak önem kazanmaktadır (38). Basit olarak katı faz ayırım yönteminde örnek, tutucu madde (adsorban) içeren kartuşa yüklenmekte, analit adsorban üzerinde kalırken safsızlığa yol açan diğer maddeler yıkanarak uzaklaştırılarak temiz bir ekstrakt elde edilmektedir. Katı faz ekstraksiyonu hızlı, güvenilir ve ekonomik olması açısından ve özellikle işlem sonunda yüksek lipidom kapsamına sahip ekstrakta olanak vermesi nedeniyle tercih edilmektedir.

ANALİTİK YÖNTEMLER

Polarite, yapısal analoglar ve izomerler nedeniyle, lipit moleküllerinin analizinde gelişmiş ayırma tekniklerinin kullanılması gerekmektedir.

Lipitlerin kalitatif ve kantitatif analizleri için; ince tabaka kromatografisi, GC, LC ve MS olmak üzere birçok analitik yöntem kullanılmaktadır. Daha önce not edildiği gibi, özellikle ESI ve yüksek znrlkl kütle spektrometreleri gibi ‘‘yumuşak’’ iyonizasyon tekniklerinin gelişmesiyle, lipidomik alanında çalışmalar artmıştır.

Günümüzde lipitleri analiz etmek için iki strateji vardır: hedeflenmiş lipit analizi ve hedeflenmemiş lipit analizi. Hedefli lipit analizi, bilinen lipitleri tanımlar ve bu spesifik lipitlerin kantitatif analizi için yüksek hassasiyete sahip yöntem geliştirir. Hedeflenmemiş lipit analizi ise tüm lipit türlerini aynı anda tanımlamayı amaçlar; ancak, spesifik analitlerin kantitasyonu açısından nispeten zayıftır.

Lipit moleküllerinin yapısal çeşitliliği nedeniyle tek başına **kromatografik** yöntemlerin kullanılması yeterli bir analiz sağlamazken günümüzde kromatografinin MS ile eşlenmesi sonrasında lipit analizlerinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

İnce tabaka kromatografisi 1960lar’ dan itibaren lipit ayırmada kullanılan en eski ve yaygın kromatografik yöntemdir. Bu yöntemde lipitler, silika jel kaplı tabakalara uygulanır ve organik üzücü (sıklıkla farklı zclerin karışımı) tabaka üzerinde ilerlerken, daha az polar lipitler daha polar ya da yüklü lipitlere göre daha hızlı hareket ederek birbirlerinden ayrılırlar (39).

Sıvı kromatografisi (LC) kompleks bileşenleri birbirinden ayırmak için ticari kolon ve yüksek basınçlı pompa kullanan bir sistemdir. Fosfolipitlerin izolasyonu ve analizi için HPLC sıklıkla kullanılmaktadır. Lipitlerin kromatografik ayırımında; sıklıkla normal fazlı sıvı kromatografisi (NPLC) ve ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC) yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) de tercih edilebilmektedir. NPLC lipit sınıflarını ayırırken, RPLC yağ aıl bileşimine göre ayırım yapar. Bu nedenle NPLC, farklı baş gruplarına sahip fosfolipitleri ayırmak için kullanışlıdır, RPLC ise aynı sınıfta yer alan fosfolipitleri yağ aıl zincir uzunluklarına, çift bağ sayısına göre ayırabilir.

NPLC ve HILIC, hidrofilik işlevselliklerine göre lipit türlerini ayırır, bu nedenle polar lipitleri ayırmak için kullanılan LC yöntemdir. NPLC’ye göre HILIC, sağlamlık ve daha iyi tekrarlanabilirlik sağlar ve MS ile daha uyumludur. Lipit ayırımı için kullanılan diğer LC teknikleri, sulu olmayan RPLC, gümüş iyonu RPLC, kiral LC ve süperkritik akışkan kromatografisi (SFC) dir. Karmaşık lipitlerin ayrılmasında off-line ve on-line iki boyutlu LC sistemleri kullanılır. SFC, hızlı lipit profillemeye tekniğidir. Süperkritik akışkanlar, normal sıvılardan daha düşük viskoziteye ve yüksek difüzyon

katsayılarına sahiptir dolayısıyla LC'den daha yüksek verim analizi sağlar (40).

Kromatografik olarak ayrıldıktan sonra, moleküller iyon kaynağına girerler ve iyonizasyona uğrarlar daha sonra kütle analizörüyle belirli iyonlar tespit edilir. İyonlar, hedeflenmemiş (tam spektrum alımı), sınıfa özgü (ürün iyon taraması, öncü iyon taraması veya nötr kayıp taraması) veya hedeflenmiş (çoklu reaksiyon izleme) şekilde farklı tarama türleriyle elde edilir.

Tüm LC-MS lipidomik uygulamalar, hedef kütle spektrumu elde etmek için kullanılan çoklu reaksiyon izleme (MRM) veya seçilen iyon izleme (SİM) modu yerine, genellikle yüksek çözünürlüklü (HR) moda sahip tam kütle spektrumu elde edebilen bir kütle spektrometresi kullanır. MRM ve SİM modlarının dezavantajı, yalnızca belirli geçişlerin veya belirli iyonların izlenmesini sağlarken, tanımlanamayan (hedeflenmemiş) lipidleri kayıttan ve veri eldesinden sonra tekrardan işleyememesidir.

LC-MS yöntemi, türevlendirme reaksiyonu gerektirmediği için, lipidomik uygulamalarda GC-MS'e kıyasla daha avantajlıdır (41).

Gaz kromatografisi (GC) 1941'de sıvı kromatografi sistemindeki hareketli faz olan sıvının bir buharla değiştirilmesiyle ortaya çıkmıştır. 1950'lerde kromatografi tekniğinin kütle spektrometresi ile birleştirilmesiyle GC-MS tekniği geliştirilmiştir. GC-MS lipid biyokimyası ve lipidomikte önemli bir ayırma tekniğidir. GC uçucu ve uçucu olabilen bileşiklerin ayrılmasında kullanılır. GC' de gerekli uçucu türler oluşturmak için türevlendirme işlemine ihtiyaç duyulur. GC, özellikle modifiye yağ asitleri için popüler bir ayırma tekniğidir. GC'nin MS'e bağlanmasıyla parçalanmış analitlerin yapısı belirlenir. GC-MS, hidroperoksitler, yağ asit hidrositleri ve izoprostanların miktar tayininde de kullanılmaktadır (42).

Kütle Spektrometresi (mass spectrometry, MS) daha duyarlı, numune kalitesindeki değişikliklere daha toleranslıdır ve manyetik ya da elektriksel bir alanda hareket eden iyonların kütle/yük (m/z) oranlarına göre tespit yapar. Ayrıca kütle ve yük çeşitli biyomoleküllerin ortak özellikleri olduğundan lipidler dışında MS, metabolitleri, karbonhidratları analiz etmekte ve bir proteindeki kütle artışına neden olan fosforilasyon veya hidroksilasyon gibi translasyon sonrası değişiklikleri de tespit etmek için kullanılır.

Kütle spektrometrik analizde üç temel olay gerçekleşir; i) analit iyonizasyonu, ii) kütleyle bağlı iyon ayrımı ve iii) iyon tespiti. İyonları m/z oranlarına göre ayırt eden kütle analizörleri kullanılır. Kuadrupol (dört kutuplu, Q), iyon tuzağı (trap), uçuş zamanlı (TOF), elektrostatik ve manyetik sektör, iyon kapanı ve iyon siklotron rezonanslı kütle analizörleri,

kütle spektrometresinde kullanılmaktadır. Analizörler, yüksek çözünürlük ve kütle doğruluğuyla analitlerin tanımlanmasını kolaylaştırır ve m/z oranı ile ayrılabilen analitlerin sayısını artırır (43). Kütle spektrometresi ile çeşitli lipit molekülleri pikomol düzeyinde ölçülebilir.

Lipidomikte temel olarak üç farklı MS yöntemi kullanılır; i) doğrudan enjeksiyonlu (shotgun) MS, ii) kromatografik ayırmalarla birleştirilmiş LC/MS ve iii) kütle spektrometrik görüntüleme (MSI) dir. Shotgun MS'te örnek kromatografik ayırma olmaksızın, doğrudan cihaza verilir. Kolon kullanılmaması önemli bir avantajdır. Diğer yöntemlere göre daha az zaman alan, daha kullanışlı ve daha tekrarlanabilir bir yöntemdir, çok fazla lipit türünü belirleyebilir. Ancak shotgun yöntemiyle düşük konsantrasyonlardaki lipit moleküllerinin analizi sınırlıdır ve lipit izomerlerini ayırt etmek zordur (44).

Lipidom pek çok farklı türdeki lipit moleküllerinden oluşur. Lipidomda çok sık rastlanan, aynı moleköl ağırlığına sahip ancak açık formülleri farklı olan 'izobarik türler'i ayırmak için tek başına MS yetersiz kalır. Doğru tanımlanabilmeleri için ardışık MS (tandem MS) sistemleri kullanılır. Ardışık MS sistemiyle, izobarik veya çok benzer kütlelere sahip lipit bileşiklerini analiz etmek mümkündür. Shotgun lipidomik analizlerde, genelde QTOF veya Orbitrap gibi hızlı tarama, yüksek çözünürlüklü MS kullanılır. İzobarik bileşikler, yüksek çözünürlüklü cihazlarla ayırt edilirken izomerik bileşikler, parçalanma (fragmentasyon), kromatografik ayırma ve iyon mobilite MS kullanılarak ayırt edilir. İyon mobilite bir gaz-fazı ayırım tekniği olup iyonların, yük, şekil ve boyutlarına göre ayırımını sağlar. İyonlar azot gibi bir gaz yoluyla, elektrik alanı altında göç ederken birbirinden ayrılır İyon mobilite MS, iyonları şekillerine göre ayırır ve farklı çift bağ konfigürasyonlarında ya da farklı sınıflardaki izobarik lipitleri ayırt etmede kullanılır(45). ESI ve MALDI MS örnekteki birden fazla bileşeni aynı anda analiz ederek, biyolojik dokudaki birçok lipit sınıfının profillenmesine olanak tanır ve shotgun lipidomiğin gelişimine katkı sağlamıştır.

Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometresi Lipidomik uygulamalarda ESI yönteminin kullanılmasının nedeni sıvı kromatografi ile doğrudan ara yüz oluşturulması ve numune hazırlamanın basit olmasıdır. ESI yönteminde çözeltideki örneğin infüzyonu gerektiğinden, HPLC' ye kolay bir şekilde bağlanabilir. Elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometresi (ESI-MS/MS) yöntemi, lipitlerin hızlı ve hassas analizini gerçekleştirir.

MALDI yönteminde ise matriksin örnek ile kristallenmesi gerekir. Ayrıca örnekteki tuz ve deterjan varlığına daha toleranslıdır. MALDI moleköl

türlerinin dokular arasındaki uzaysal dağılımları hakkında bilgi edinmek için MS görüntüleme için çok kullanılan tekniktir. Lipit analizinde genellikle ESI, atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) ve yüzey analizi için lazer bazlı MS yöntemleri kullanılır. Ayrıca lipidomik yöntemlerde yüksek çözünürlüklü olan Orbitrap, Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans kütle spektrometresi (FT-ICR-MS) ve dört kutuplu uçuş zamanlı kütle spektrometresi (QTOF-MS) kullanılır (46).

Özellikle sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresindeki teknolojik gelişmeler, lipitlerin hassas ve spesifik analizini sağlamaktadır. MS teknolojilerindeki ilerleme, lipitleri ve çeşitli hastalıklarda lipit etkisini anlamamızı sağlayan, lipidomik alanına yol açmıştır. Lipit profillerinin hem hedeflenmiş hem de hedeflenmemiş karşılaştırmalı analizleri, lipit hücre biyolojisinin incelenmesinde ve hastalıklar için yeni ilaç ve biyobelirteçlerin keşfedilmesinde özellikle önemlidir.

Veri işleme

Veri toplama sürecinden sonra en önemli adım ham veri işlemedir. LC-MS analizi, alıkonma zamanı, m/z değerini ve sinyal yoğunluğunu ölçmeyi sağlar. Veri işleme süreci birçok aşamadan geçer:

1. filtreleme
2. özellik saptama
3. sıralama
4. normalleştirme

Filtreleme yöntemi, gürültüyü veya taban çizgisini ortadan kaldırmak amacıyla ham sinyali işler. Özellik saptama, gerçek iyonların neden olduğu tüm sinyalleri tanımlamak ve yanlış pozitiflerin tespit edilmesini önlemek için yapılır. Sıralama yöntemi, çalışmalar arasındaki alıkonma zamanı farklılıklarını düzeltmek ve farklı örneklerden alınan verileri birleştirmek için gereklidir. Normalleştirme adımları ise ölçümler arasında veya numune hazırlama sırasında iyon yoğunluklarında istenmeyen sistematik yanlılığa neden olan faktörleri ortadan kaldırır.

Farklı peak-processing (pik işleme) yazılımlarının uygulanması, bir çalışmanın sonucu üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir. Dört olası yaklaşım vardır:

1. Cihaz satıcısının yazılımını kullanmak (MarkerLynx, MarkerView, Mass Profiler Professional, MassHunter/Genespring, MetQuest, SIEVE);

2. MS verilerinin çoğunu işleyebilen bağımsız geliştiricilerin özel yazılımlarını kullanmak (GeneData, Lipostar, LipidBlast, MSDIAL);
3. Açık erişim yazılımını kullanmak (XCMS, MZmine, MetAlign, IDEOM)
4. Kendi kodlarını geliştirmek (Matlab, R)

KLİNİK LİPIDOMİK

Genomik, transkriptomik, proteomik alanlarına benzer şekilde lipidomik de hızlı bir şekilde biyomedikal uygulamalara ve klinik araştırmalara konu olmaya doğru ilerlemiştir(1, 47). İşabetli kantifikasyon sağlayan gelişmiş yöntemlerin kullanıldığı lipidomik analizlere dayalı, tanısal biyobelirteç arayan klinik çalışmalar 15 yıldan fazla bir suredir yürütülmektedir. Günümüzde lipidomun tümünün kantitatif bir şekilde ortaya çıkarılması ve ayrıntılı ilişkilerin gösterilmesi henüz mümkün olmasa da hedeflenmiş lipidomik uygulamaları sayesinde belirli lipitlerin spesifik şartlar veya hastalıklarda gösterdikleri değişimler ortaya konabilmektedir (48, 49).

Lipitler ve hastalıklar

Kalıtısal metabolik hastalıkların tanısında hedefli lipidomik analizler uzun suredir kullanılmaktadır. Yağ asidi oksidasyonu ile ilgili doğuştan metabolik bozukluklar ve peroksizmal hastalıkların tanısı için kullanılan hedefli lipidomik analizler oldukça değerlidir (50). Nieman-Pick Tip C ve A/B hastalıkları, Smith-Lemli-Opitz sendromu gibi hastalıklarda hedefli oksisterol limleri tanısal yetkinlikte sonuçlar elde edilmektedir (51). Yine Fabry, Gaucher ve Krabbe hastalıkların tanısı, takibi ve tedavi izleminde lizosfingolipitlerin LC-MS ile hedefli lipidomik analizi çok değerlidir (52).

Diğer yandan gelişen teknoloji, lipidom kavramıyla ilgili farkındalığının artması ve lipidomik analiz yöntemlerinin yaygınlık kazanmasıyla beraber, klinik lipidomik çalışma sayısında önemli artış olmuştur. Bunun neticesinde de lipitlerle doğrudan veya dolaylı ilişki gösterdiği tespit edilen hastalıkların listesi gün geçtikçe uzamaktadır (53). Ateroskleroz, şitli kanserler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi küresel anlamda morbidite ve mortalite kaynağı olan hastalıkların (54-56) yanı sıra tanısı veya tedavisinde yeni gelişmelere ihtiyaç duyulan, ‘nadir’ hastalıklar da lipidomiğin ilgi alanında bulunmaktadır (57). Nasıl ki metabolizmanın bütün elemanları hastalıklarla değişim gösterebiliyorsa, lipidom da hastalık patofizyolojisine bağlı olarak şitli değişiklikler gösterebilmektedir (58). Dolayısıyla lipidomik analizler ile, özellikle şitli hastalıkların tanısında kullanılabilir yeni biyobelirteçlerin keşi mümkün olabilecektir (1, 5).

Kansere baktığımızda çeşitli lipitlerin over (59), prostat (60), larinks (61), pankreas (62) ve akciğer (63) kanserleri için tanısal özellik gösterebileceği veya mevcut tanı yaklaşımlarının isabetini artırabileceği gösterilmiştir. Diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz ve diğer kalp hastalıkları gibi kronik hastalıkların da tanısında veya prognozunu belirlemede lipitlerin analiz edilmesinin faydalı olabileceği raporlanmıştır (64-68). Bunların yanı sıra, nörolojik hastalıkların tanısında da lipidomik analizlerin rolü olabileceği ve seyrin belirlenmesine katkı sunabileceği düşünülmektedir (69).

Tanısal rolden ötesi

Lipidomik analizlerin kullanımına yalnızca tanısal açıdan yaklaşmak doğru değildir; çünkü tek amaç global lipidom analizi yaparak hastalık durumunda artan ve azalan lipitlerin tespit edilmesi değildir. Lipitlerin bu hastalıkların seyri, patofizyolojisi ve prognozu ile olan ilişkilerini tespit etmek de artık önemli bir hale gelmiştir (70). Örneğin, lipidomun çeşitli akciğer hastalıklarında (ağır pnömoni, pulmoner emboli ve kronik akciğer hastalıklarının alevlenme dönemi) görülen değişikliklerini ve bu değişimlerin lipitlerle ilişkisini inceleyen bir çalışmada lipidomik analizlerin bu hastalıklar için yeni biyomarker olarak kullanılabileceği ve terapötik potansiyel gösterebileceği savunulmuştur (71).

Klinik lipidomik uzun dönemde hastalık tanısında önemli bir çığır açacak görünmektedir. Hem temel hem de klinik biyokimya araştırmacıları, gelişmekte olan bu alanla ilgili yenilikleri takip etmek ve sağlık bilimleri alanındaki potansiyel katkısının farkında olmak zorundadır.

KAYNAKLAR

1. Lv J, Zhang L, Yan F, Wang X. Clinical lipidomics: a new way to diagnose human diseases. *Clin Transl Med.* 2018;7(1):12.
2. Liebisch G, Fahy E, Aoki J, Dennis EA, Durand T, Ejsing CS, et al. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J Lipid Res.* 2020;61(12):1539-55.
3. Han X, Gross RW. 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(6):1071-9.
4. Alves MA, Lamichhane S, Dickens A, McGlinchey A, Ribeiro HC, Sen P, et al. Systems biology approaches to study lipidomes in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2021;1866(2):158857.
5. Wei F, Lamichhane S, Oreřiř M, Hyötyläinen T. Lipidomes in health and disease: Analytical strategies and considerations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2019;120:115664.
6. McNamara JR, Warnick GR, Cooper GR. A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta.* 2006;369(2):158-67.
7. Labrude P, Becq C. [Pharmacist and chemist Henri Braconnot]. *Rev Hist Pharm (Paris).* 2003;51(337):61-78.
8. Hood B. Alexander Borodin: multi-talented chemical pathologist. *Bulletin of the Royal College of Pathologists.* 2004(126.31-32).
9. Liebermann C, Cybulski G. Über Hygrin und Hygrinsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* 1895;28(1):578-85.
10. Myant NB. *The biology of cholesterol and related steroids: Butterworth-Heinemann;* 2014.
11. Kendall FE. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem.* 1952;195:357-66.
12. Fredrickson DS. Phenotyping. On reaching base camp (1950-1975). *Circulation.* 1993;87(4 Suppl):Iii1-15.
13. Mehta NJ, Khan IA. Cardiology's 10 greatest discoveries of the 20th century. *Texas Heart Institute Journal.* 2002;29(3):164.
14. Frängsmyr T, Lindsten JE. *Physiology or medicine: 1981-1990: World Scientific Pub Co Inc;* 1993.
15. Olson RE. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *The Journal of nutrition.* 1998;128(2):439S-43S.
16. Gorter E, Grendel F. on Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *J Exp Med.* 1925;41(4):439-43.

17. Goldstein J, Brown M. Cholesterol, a century of research Howard Hughes. *Med Inst Bull.* 2003;16(3).
18. Lindgren FT, Elliott HA, Gofman JW. The ultracentrifugal characterization and isolation of human blood lipids and lipoproteins, with applications to the study of atherosclerosis. *The Journal of Physical Chemistry.* 1951;55(1):80-93.
19. Vartiainen I, Kanerva K, editors. *Arteriosclerosis and war-time.* *Annales medicinae internae Fenniae;* 1947.
20. The nobel prize. <https://www.nobelprize.org/> 2022 [Available from: <https://www.nobelprize.org/>].
21. Hannun YA, Loomis CR, Merrill AH, Jr., Bell RM. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem.* 1986;261(27):12604-9.
22. Ameer A, Enroth S, Johansson Å, Zaboli G, Igl W, Johansson AC, et al. Genetic adaptation of fatty-acid metabolism: a human-specific haplotype increasing the biosynthesis of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids. *The American Journal of Human Genetics.* 2012;90(5):809-20.
23. Erny D, de Angelis ALH, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature neuroscience.* 2015;18(7):965-77.
24. Melo T, Domingues P, Ferreira R, Milic I, Fedorova M, Santos SM, et al. Recent advances on mass spectrometry analysis of nitrated phospholipids. *Analytical chemistry.* 2016;88(5):2622-9.
25. Chew WS, Torta F, Ji S, Choi H, Begum H, Sim X, et al. Large-scale lipidomics identifies associations between plasma sphingolipids and T2DM incidence. *JCI insight.* 2019;4(13).
26. Akiyama H, Ide M, Nagatsuka Y, Sayano T, Nakanishi E, Uemura N, et al. Glucocerebrosidases catalyze a transgalactosylation reaction that yields a newly-identified brain sterol metabolite, galactosylated cholesterol. *Journal of Biological Chemistry.* 2020;295(16):5257-77.
27. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):139-50.
28. Lange M, Angelidou G, Ni Z, Criscuolo A, Schiller J, Blüher M, et al. AdipoAtlas: A reference lipidome for human white adipose tissue. *Cell Rep Med.* 2021;2(10):100407.
29. Holčápek M, Liebisch G, Ekroos K. Lipidomic Analysis. *Anal Chem.* 2018;90(7):4249-57.
30. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.

31. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911-7.
32. Caprioli G, Giusti F, Ballini R, Sagratini G, Vila-Donat P, Vittori S, et al. Lipid nutritional value of legumes: Evaluation of different extraction methods and determination of fatty acid composition. *Food Chem.* 2016;192:965-71.
33. Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res.* 2008;49(5):1137-46.
34. Sostare J, Di Guida R, Kirwan J, Chalal K, Palmer E, Dunn WB, et al. Comparison of modified Matyash method to conventional solvent systems for polar metabolite and lipid extractions. *Anal Chim Acta.* 2018;1037:301-15.
35. Ulmer CZ, Jones CM, Yost RA, Garrett TJ, Bowden JA. Optimization of Folch, Bligh-Dyer, and Matyash sample-to-extraction solvent ratios for human plasma-based lipidomics studies. *Anal Chim Acta.* 2018;1037:351-7.
36. Löfgren L, Forsberg GB, Ståhlman M. The BUMÉ method: a new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue. *Sci Rep.* 2016;6:27688.
37. Medina J, van der Velpen V, Teav T, Guitton Y, Gallart-Ayala H, Ivanisevic J. Single-Step Extraction Coupled with Targeted HILIC-MS/MS Approach for Comprehensive Analysis of Human Plasma Lipidome and Polar Metabolome. *Metabolites.* 2020;10(12).
38. Apffel A, Zhao L, Sartain MJ. A Novel Solid Phase Extraction Sample Preparation Method for Lipidomic Analysis of Human Plasma Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Metabolites.* 2021;11(5).
39. Touchstone JC. Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 1995;671(1):169-95.
40. Pati S, Nie B, Arnold RD, Cummings BS. Extraction, chromatographic and mass spectrometric methods for lipid analysis. *Biomed Chromatogr.* 2016;30(5):695-709.
41. Cajka T, Fiehn O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends Analyt Chem.* 2014;61:192-206.
42. Mubiru E, Shrestha K, Papastergiadis A, De Meulenaer B. Improved gas chromatography-flame ionization detector analytical method for the analysis of epoxy fatty acids. *Journal of Chromatography A.* 2013;1318:217-25.

43. Awad H, Khamis MM, El-Anead A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2015;50:158 - 75.
44. Han X, Gross RW. Shotgun lipidomics: multidimensional MS analysis of cellular lipidomes. *Expert Rev Proteomics*. 2005;2(2):253-64.
45. Spickett CM, Pitt AR. Oxidative lipidomics coming of age: advances in analysis of oxidized phospholipids in physiology and pathology. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(18):1646-66.
46. Fuchs B, Süß R, Schiller J. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog Lipid Res*. 2011;50(1):132.
47. Zhao YY, Cheng XL, Lin RC. Lipidomics applications for discovering biomarkers of diseases in clinical chemistry. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2014;313:1-26.
48. Mohammad NS, Nazli R, Zafar H, Fatima S. Effects of lipid based Multiple Micronutrients Supplement on the birth outcome of underweight pre-eclamptic women: A randomized clinical trial. *Pak J Med Sci*. 2022;38(1):219-26.
49. Hussain G, Anwar H, Rasul A, Imran A, Qasim M, Zafar S, et al. Lipids as biomarkers of brain disorders. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(3):351-74.
50. Guerra IMS, Ferreira HB, Melo T, Rocha H, Moreira S, Diogo L, et al. Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation Disorders: From Disease to Lipidomic Studies-A Critical Review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(22).
51. Degtyareva AV, Proshlyakova TY, Gautier MS, Degtyarev DN, Kamenets EA, Baydakova GV, et al. Oxysterol/chitotriosidase based selective screening for Niemann-Pick type C in infantile cholestasis syndrome patients. *BMC Med Genet*. 2019;20(1):123.
52. Polo G, Burlina AP, Ranieri E, Colucci F, Rubert L, Pascarella A, et al. Plasma and dried blood spot lysosphingolipids for the diagnosis of different sphingolipidoses: a comparative study. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(12):1863-74.
53. Yang K, Han X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(11):954-69.
54. Solati Z, Ravandi A. Lipidomics of Bioactive Lipids in Acute Coronary Syndromes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5).
55. Leishman E, Kunkler PE, Hurley JH, Miller S, Bradshaw HB. Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases : Acute and Chronic Mild Traumatic Brain Injury Differentially Changes Levels of Bioactive Lipids in the CNS Associated with Headache. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1161:193-217.
56. Sacks D, Baxter B, Campbell BCV, Carpenter JS, Cognard C, Dippel D, et al. Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consen-

- sus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke. *Int J Stroke*. 2018;13(6):612-32.
57. Dunn TM, Tiffit CJ, Proia RL. A perilous path: the inborn errors of sphingolipid metabolism. *J Lipid Res*. 2019;60(3):475-83.
 58. Gowda GA, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Rafferty D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8(5):617-33.
 59. Buas ME, Drescher CW, Urban N, Li CI, Bettcher L, Hait NC, et al. Quantitative global lipidomics analysis of patients with ovarian cancer versus benign adnexal mass. *Sci Rep*. 2021;11(1):18156.
 60. Butler LM, Mah CY, Machiels J, Vincent AD, Irani S, Mutuku SM, et al. Lipidomic Profiling of Clinical Prostate Cancer Reveals Targetable Alterations in Membrane Lipid Composition. *Cancer Res*. 2021;81(19):4981-93.
 61. Yu B, Wang J. Lipidomics Identified Lyso-Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine as Potential Biomarkers for Diagnosis of Laryngeal Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:646779.
 62. Zhou D, Mu D, Cheng M, Dou Y, Zhang X, Feng Z, et al. Differences in lipidomics may be potential biomarkers for early diagnosis of pancreatic cancer. *Acta Cir Bras*. 2020;35(5):e202000508.
 63. Wang G, Qiu M, Xing X, Zhou J, Yao H, Li M, et al. Lung cancer scRNA-seq and lipidomics reveal aberrant lipid metabolism for early-stage diagnosis. *Sci Transl Med*. 2022;14(630):eabk2756.
 64. Kim EJ, Ramachandran R, Wierzbicki AS. Lipidomics in diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2022;29(2):124-30.
 65. Kulkarni H, Meikle PJ, Mamtani M, Weir JM, Barlow CK, Jowett JB, et al. Plasma lipidomic profile signature of hypertension in Mexican American families: specific role of diacylglycerols. *Hypertension*. 2013;62(3):621-6.
 66. Stegemann C, Pechlaner R, Willeit P, Langley SR, Mangino M, Mayr U, et al. Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based Bruneck study. *Circulation*. 2014;129(18):1821-31.
 67. Soppert J, Lehrke M, Marx N, Jankowski J, Noels H. Lipoproteins and lipids in cardiovascular disease: from mechanistic insights to therapeutic targeting. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159:4-33.
 68. Samadi A, Sabuncuoglu S, Samadi M, Isikhan SY, Chirumbolo S, Peana M, et al. A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases. *Curr Med Chem*. 2021;28(1):110-36.
 69. Shamim A, Mahmood T, Ahsan F, Kumar A, Bagga P. Lipids: An insight into the neurodegenerative disorders. *Clinical Nutrition Experimental*. 2018;20:1-19.

70. Meikle TG, Huynh K, Giles C, Meikle PJ. Clinical lipidomics: realizing the potential of lipid profiling. *J Lipid Res.* 2021;62:100127.
71. Gao D, Zhang L, Song D, Lv J, Wang L, Zhou S, et al. Values of integration between lipidomics and clinical phenomes in patients with acute lung infection, pulmonary embolism, or acute exacerbation of chronic pulmonary diseases: a preliminary study. *J Transl Med.* 2019;17(1):162.