

- ! *Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.*

JOANNA CZAJKOWSKA<sup>1, 2</sup> | ADAM JUNKKA<sup>3</sup> | AGATA MARKOWSKA-SZCZUPAK<sup>2</sup>

## ZASTOSOWANIE METABOLOMIKI JAKO PRZYSZŁEGO NARZĘDZIA W SZYBKIEJ DIAGNOSTYCE RAN PRZEWLEKŁYCH

METABOLOMICS AS A NEW APPROACH IN FAST CHRONIC WOUND DIAGNOSIS

**STRESZCZENIE:** Starzejące się społeczeństwo oraz rosnąca liczba chorych ze schorzeniami cywilizacyjnymi, takimi jak cukrzyca oraz choroby układu naczyniowego, przekładają się na wzrost liczby pacjentów z ranami trudno gojącymi się. Brak szybkich metod identyfikacji czynnika etiologicznego zakażenia rany przewlekłej może prowadzić do zbyt późnego wdrożenia odpowiednich procedur leczniczych, a w efekcie do wysokich kosztów terapii, pogorszenia komfortu życia oraz stanu zdrowotnego. Za infekcje ran przewlekłych odpowiedzialne są drobnoustroje w formie biofilmowej, której parametry są unikalne dla poszczególnych gatunków mikroorganizmów. Dlatego konieczne jest opracowanie technik diagnostycznych umożliwiających szybką identyfikację danego biofilmu i zastosowanie metod terapeutycznych opartych na algorytmie Biofilm-Based Wound Care. Mimo szeroko zakrojonych badań mających na celu identyfikację biomarkerów związanych z daną jednostką chorobową, opracowanie testu diagnostycznego, który mógłby być rutynowo stosowany w praktyce klinicznej, nadal pozostaje wyzwaniem. W niedalekiej przyszłości rozwój metabolomiki, dyscypliny analizującej całkowity zbiór metabolitów wytwarzanych przez dany makroorganizm lub mikroorganizm, może dostarczyć narzędzi diagnostycznych służących szybkiej i wiarygodnej identyfikacji biofilmów zasiedlających ranę. Materiałem diagnostycznym o potencjalnie najwyższym zastosowaniu w przyszłej analizie metabolomu z rany jest wysięk – płyn surowiczy, do którego wydzielane są metabolity zarówno drobnoustrojów, jak i te pochodzące ze zmienionych chorobowo komórek przyrannych.

**SŁOWA KLUCZOWE:** biofilm, biomarkery, diagnostyka, infekcje, metabolomika, rany przewlekłe

**ABSTRACT:** The ageing society and increasing number of people suffering from lifestyle diseases such as diabetes and cardiovascular disease are a cause of most of the chronic wounds cases. Lack of rapid diagnostic methods for identification of an etiological agent of infection can lead to late implementation of appropriate treatment. This in turn, results in high costs of therapy, deterioration of patient's life quality and health condition. The main cause of chronic wound infections are microorganisms living in a unique biofilm form. Biofilm has very various species-dependent parameters. Therefore, there is an urgent need to develop a diagnostic approach that enables fast identification of biofilm type and application of the treatment based on the Biofilm-Based Wound Care algorithm. Serous fluid, referred to as the exudate, can be used as a diagnostic material in metabolomic analysis provides a wealth of information about the status of the wound. This is due to the fact that exudate contains host' and pathogens' metabolites. Development of a new diagnostic test based on a biomarker associated with a specific disease entity that could be routinely used is still a challenge for scientists. Metabolomics is a discipline that analyzes the total set of metabolites of an organism. In the near future, it may provide diagnostic tools to quickly and reliably identify biofilms that colonize the wound.

**KEY WORDS:** biofilm, biomarkers, chronic wounds, diagnostic tool, infections, metabolomics

- 1 Laboratorium Mikrobiologii Wrocławskiego Centrum Badań EIT+
- 2 Instytut Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
- 3 Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

✉ **JOANNA CZAJKOWSKA**  
Laboratorium Mikrobiologii,  
Wrocławskie Centrum Badań EIT+,  
ul. Stabłowicka 147, 54-066 Wrocław,  
e-mail: joanna.czajkowska@eitplus.pl

Wpłynęło: 07.12.2017

Zaakceptowano: 20.02.2018

DOI: [dx.doi.org/10.15374/LR2017031](https://doi.org/10.15374/LR2017031)

- ! *Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.*

## METABOLOMIKA

Metabolomika jest stosunkowo nową dyscypliną naukową, poświęconą badaniom nad metabolomem, czyli całkowitym zbiorem metabolitów danego organizmu, tkanki, komórki lub próbki biologicznej. Tworzone metabolity są wynikiem wszystkich procesów fizjologicznych oraz patofizjologicznych przebiegających w organizmie w jednostce czasu. Metabolom podlega ciągłym zmianom, które są skutkiem prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych oraz ich zaburzeń. Jego skład odzwierciedla funkcjonowanie genomu oraz proteomu, zatem jest obrazem fenotypu badanego organizmu [1]. Oznacza to, że dzięki analizie metabolomicznej można uzyskać wiarygodne dane o stanie zdrowotnym/chorobowym pacjenta. Metabolomika cieszy się coraz większym zainteresowaniem wśród badaczy, o czym świadczy rosnąca liczba publikacji naukowych z tej dziedziny (Ryc. 1).

Zaletą analiz metabolomicznych jest względnie niewielka liczba metabolitów (6000–10 000), które stanowią przedmiot badań [2]. Dla porównania, liczba transkryptów w transkryptomie wynosi około 100 000, genów w ludzkim genomie – około 25 000, a białek w proteomie – 1 000 000 [3]. Dzięki wykorzystaniu metod, takich jak spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. nuclear magnetic resonance – NMR) czy spektrometria masowa (ang. mass spectrometry – MS), możliwe jest jednocześnie i szybkie oznaczenie kilku tysięcy metabolitów w obrębie danej próbki. Analiza tych danych za pomocą zaawansowanych algorytmów statystycznych, np. PCA (ang. primary component analysis), pozwala na wyszczególnienie metabolitów korelujących z badanym stanem pacjenta (np. określoną jednostką chorobową). Dzięki temu metabolomika staje się narzędziem, które może być wykorzystywane zarówno w farmaceutyce, jak i w prewencyjnej opiece zdrowotnej. W medycynie przełomem mogą okazać się badania mające na celu identyfikację nowych biomarkerów będących wskaźnikami danej choroby lub ryzyka zapadalności na nią. Ponadto poznanie ludzkiego metabolomu umożliwi monitorowanie reakcji pacjenta na zastosowaną terapię (leczenie personalizowane).

## STRATEGIE STOSOWANE W METABOLOMICIE

Obecnie w metabolomicie można wyróżnić cztery najczęściej stosowane strategie badawcze:

- metaboliczny „odcisk palca” (ang. metabolic fingerprint) – celem jest identyfikacja próbki, którą ocenia się na podstawie kompleksowej analizy prowadzącej do stworzenia unikalnego wzoru. Poszczególne składniki metabolomu nie są identyfikowane i analizowane ilościowo, dzięki czemu metoda nie wymaga użycia wysokorozdzielczych technik badawczych. Analizą

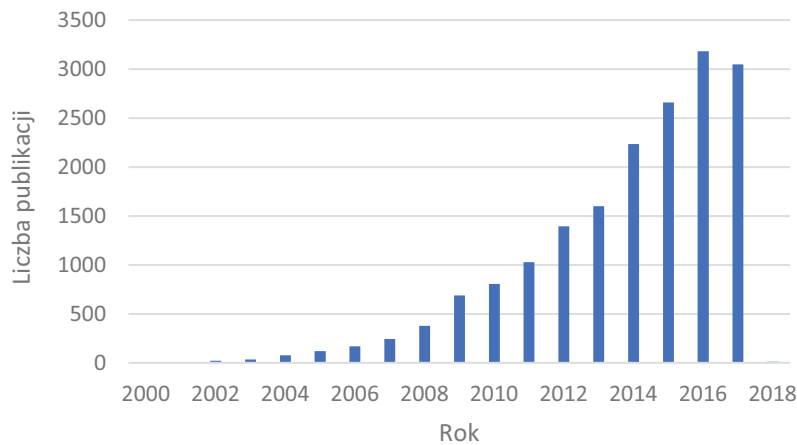
objęte są metabolity pochodzące z cytoplazmy badanych komórek (mikroorganizmów, pacjenta) [4];

- metaboliczny „odcisk stopy” (ang. metabolic footprint) – metoda analogiczna do wyżej wymienionej, z tą różnicą, że analiza dotyczy metabolitów wydzielanych do środowiska. Technika jest mało inwazyjna, gdyż nie istnieje konieczność wydzielania (ekstrakcji) metabolitów z badanego organizmu. Jest to metoda o potencjalnie najwyższym zastosowaniu w szybkiej diagnostyce mikrobiologicznej ran przewlekłych [5];
- profil metaboliczny (ang. metabolic profile) – metoda, która wymaga analizy dużej ilości metabolitów, obejmującej identyfikację oraz ocenę ilościową. Niezbędne jest zastosowanie technik wysokorozdzielczych, takich jak: wysokosprawną chromatografię cieczową (ang. high-performance liquid chromatography – HPLC), chromatografię gazową (ang. gas chromatography – GC) lub elektroforeza kapilarna (ang. capillary electrophoresis – CE). Wykorzystanie tej metody do celów badań podstawowych pozwala na odkrycie nieznanych dotąd zmian metabolicznych i umożliwia poszukiwanie ich przyczyn. W kontekście aplikacyjnym (szczególnie klinicznym) analiza profili metabolicznych umożliwia wykrycie nowych biomarkerów infekcji, które mogą w przyszłości pomóc w opracowaniu testów diagnostycznych [6];
- metabolomika celowana (ang. targeted metabolomics) – metoda skupiona wokół jednego lub kilku metabolitów, wymaga ich precyzyjnej identyfikacji oraz pomiaru ilościowego. Analizowanym metabolitem może być znany wcześniej biomarker lub cząsteczka uczestnicząca w opisanych już szlakach metabolicznych. W tej metodzie stosowane techniki są dobierane indywidualnie do określonego metabolitu – tak, by zapewnić wysoką czułość i selektywność pomiaru [7].

## BIOMARKERY

Biomarkery to substancje biologiczne, których poziom jest mierzalny i może zostać uznany za wskaźnik przebiegu procesów biologicznych, patologicznych lub odpowiedzi farmakologicznej na terapię [8, 9]. Obecnie są one szeroko stosowane w codziennej praktyce klinicznej w celu diagnostyki i oceny stopnia nasilenia choroby oraz monitorowania odpowiedzi na leczenie. Jednym z najprostszych i najpowszechniejszych przykładów jest oznaczenie poziomu glukozy we krwi, który jest zarazem wskaźnikiem ryzyka zachorowania na cukrzycę, jak i parametrem pozwalającym na ocenę odpowiedzi organizmu pacjenta na zastosowaną terapię [10]. Innym z przykładów jest oznaczanie poziomu hormonów we krwi lub innych płynach fizjologicznych. Biomarkery są również bardzo użyteczne w diagnostyce

- ! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.



Ryc. 1. Rosnąca liczba publikacji naukowych dotyczących metabolomiki w latach 2000–2018. Na podstawie wyników uzyskanych z bazy PubMed dla hasła: „metabolomika” (data dostępu: 18.10.2017).

choroby nowotworowej. Wiele zmian w metabolizmie zachodzi już na wczesnym etapie tej jednostki chorobowej. Wykrycie ich i powiązanie z rozwojem nowotworu może pozwolić na wczesną diagnozę, a tym samym zapewnić lepsze rokowanie pacjentom [11]. Ponadto biomarkery takie mogą zostać wykorzystane do określenia stadium choroby oraz wyboru strategii leczenia.

## RANY PRZEWLEKŁE

Leczenie ran przewlekłych wciąż pozostaje olbrzymim wyzwaniem dla światowych systemów opieki zdrowotnej. Szacuje się, że postępowanie diagnostyczno-lecznicze i opieka pochłania około 3% środków przeznaczanych na ochronę zdrowia w krajach rozwiniętych [12]. Oprócz względów finansowych, rany przewlekłe powodują pogorszenie jakości życia pacjentów oraz ich rodzin. Są źródłem dyskomfortu fizycznego oraz psychicznego. W wielu przypadkach prowadzą do niepełnosprawności, gdyż w związku z zagrożeniem życia chorego przyczyniają się do amputacji. Szacuje się, że wystąpienie owrzodzeń żylnych poprzedza 85% wszystkich przeprowadzanych amputacji, a 70% zabiegów odjęcia kończyn dolnych jest skutkiem powikłań związanych z cukrzycą [13, 14]. Grupą wyjątkowo narażoną na ryzyko związane z powstaniem rany przewlekłej są ludzie starsi i otyli, często cierpiący na schorzenia sercowo-naczyniowe oraz cukrzycę, a także pacjenci o obniżonej sprawności układu immunologicznego i systemów regeneracji komórkowej [15].

Rany przewlekłe – owrzodzenia goleni, zespół stopy cukrzycowej (ZSC), oparzenia i odleżyny – definiuje się jako rany nieulegające prawidłowemu procesowi leczenia w czasie około czterech tygodni. Najczęściej objęte są one stanem zapalnym hamującym ten proces [16]. Wyodrębniono wiele czynników mających wpływ na pozostawanie rany w stanie przewlekłym, np.: choroby współistniejące (takie jak: cukrzyca, otyłość czy niedożywienie), stosowane leki (w tym steroidy, niesteroidowe leki przeciwzapalne), terapie onkologiczne oraz niehigieniczny tryb życia (palenie,

nadużywanie alkoholu) [17]. Kluczowym czynnikiem mającym wpływ na zahamowanie gojenia, a nawet pogorszenie się stanu rany, jest obecność w jej obrębie drobnoustrojów w formie biofilmu. Znamienitą większość patogenów w warunkach naturalnych (nielaboratoryjnych) cechuje skłonność do agregacji i produkcji ochronnej macierzy biofilmowej [18]. Początkowym etapem tworzenia biofilmu jest osiadanie na powierzchni (adhezja) bądź autoagregacja. Kolejną fazą jest namnażanie się i różnicowanie komórek drobnoustrojów oraz wytwarzanie egzopolimerów macierzy ochronnej (ang. extracellular polymeric substance – EPS). Jej skład różni się w zależności od rodzaju mikroorganizmu i może zawierać: polisacharydy, białka, glikolipidy oraz zewnątrzkomórkowy DNA [19]. Dojrzała forma biofilmu może wydzielać pojedyncze kolonie bakterii w formie planktonicznej lub swoje fragmenty i w ten sposób przenosić się w kolejne miejsca rany, prowadząc do kolonizacji nowych nisz (dyspersja biofilmu). Biofilm jest jedno- lub wielogatunkowy. W obrębie macierzy drobnoustroje różnych gatunków mogą wymieniać pomiędzy sobą zarówno plazmidowe, jak i chromosomalne czynniki oporności, co w efekcie następuje istotnych trudności w eradykacji tej struktury za pomocą środków przeciwdrobnoustrojowych, szczególnie antybiotyków [20]. Biofilm cechuje się także znacznie podwyższoną odpornością na odpowiedź immunologiczną organizmu w porównaniu do komórek tzw. wolno pływających (ang. free-swimmers) [21].

Istnieją doniesienia mówiące o tym, że antybiootykooporność biofilmu wzrasta wraz z jego rozwojem (ang. maturation, dojrzewanie). Usunięcie jednej z jego warstw na skutek działania antybiotyku powoduje odsłonięcie kolejnej warstwy komórek, które w wyniku zmniejszonej ilości czynników odżywczych i wzrostowych docierających do nich przez macierz znajdowały się w fazie metabolicznego uśpienia (anabiozy). Odsłonięcie wzmiankowanej warstwy skutkuje aktywacją metaboliczną biofilmu i odtworzeniem struktury. Oznacza to, iż biofilm powinien być usuwany w ciągu pierwszych 48 godzin od zakażenia, wówczas gdy jest jeszcze niedojrzały, a liczba tworzących go

- ! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

warstw mniejsza. Debridement, czyli oczyszczanie chirurgiczne (bądź za pomocą środków chemicznych) rany z biofilmu sprzyja szybszemu gojeniu. Niecałkowite usunięcie struktury tworzonej przez patogeny oportunistyczne skutkuje odnowieniem się jej w ciągu około 24 godzin, dlatego też zabieg musi być regularnie powtarzany [22].

## DIAGNOSTYKA RAN PRZEWLEKŁYCH

Pierwszym wskazaniem do diagnostyki infekcji rany są objawy, takie jak: miejscowe zaczerwienienie, ból, podniesiona temperatura ciała, uszkodzenia tkanek, obrzęk i ropny wysięk. Ponadto wykonanie odpowiednich badań jest zalecane również w sytuacji nieprawidłowego procesu gojenia oraz obecności przykrego zapachu wydobywającego się z rany. Niestety, w przypadku ran przewlekłych wyżej wymienione klasyczne objawy infekcji mogą przez długi czas być maskowane, co utrudnia proces diagnostyczny. Dlatego konieczne jest wykonanie badań mikrobiologicznych, obejmujących analizę bioptatu lub wymazu pobranego z rany [16].

Identyfikację gatunkową drobnoustrojów pochodzących z rany utrudnia fakt, iż biofilm niezwykle rzadko pokrywa całą jej powierzchnię. Brak kofluencji tej struktury, a także możliwość występowania mikroorganizmów o specyficznych wymaganiach wzrostowych (bądź patogenów niehodowlanych *in vitro*) mogą przyczynić się do uzyskania fałszywie ujemnych wyników badania mikrobiologicznego. Zastosowanie metod genetycznych, w tym genomicznych, do celów diagnostycznych pozwala „jedynie” na wykrycie kwasu nukleinowego drobnoustrojów, co nie w każdym przypadku koreluje z faktyczną obecnością żywych mikroorganizmów w ranie. Co więcej, standardowo stosowane metody hodowli i identyfikacji są sprofilowane pod kątem bakterii w formie planktonicznej, która, jak wspomniano już wcześniej, w naturze występuje stosunkowo rzadko i często jako etap pośredni między dyspersją dojrzałego biofilmu a utworzeniem nowej struktury. Dlatego niezwykle istotne jest opracowanie nowych metod diagnostycznych, które umożliwiłyby nie tylko szybką identyfikację drobnoustrojów, lecz także wykrycie w ranie obecności różnego rodzaju biofilmów.

## METABOLOMICZNA ANALIZA WYSIĘKU

Wysięk jest jednym z elementów odpowiedzi immunologicznej organizmu, odgrywającym bardzo ważną rolę w procesie gojenia rany. Jest to wodny roztwór wypływający z rany, zawierający między innymi: elektrolity, składniki odżywcze, białka, metaloproteiny, czynniki wzrostu, neutrofile, makrofagi oraz mikroorganizmy. Wysięk wspiera proces gojenia, ułatwiając dyfuzję czynników wzrostu

i składników odżywczych oraz migrację komórek układu immunologicznego w obrębie rany. Jego skład jest bezpośrednio związany ze stanem rany [23]. W procesie leczenia zmienia się jego ilość, kolor oraz konsystencja. Infekcja powstała w ranie prowadzi do zmiany właściwości fizykochemicznych tego płynu. Wysięk gromadzący się w łożysku rany skupia metabolity pochodzące z komórek przyrannych, komórek układu immunologicznego oraz z kolonizujących/infekujących ranę drobnoustrojów (wspomniany footprint metaboliczny). Dzięki jego analizie można zatem uzyskać kompleksowy obraz procesów zachodzących w ranie.

Mikroorganizmy produkują wiele specyficznych metabolitów i fakt ten od dawna znajduje zastosowanie w przemyśle żywnościowym (wykorzystanie *Corynebacterium glutamicum* do produkcji L-glutaminianu i L-lizyny) i farmaceutycznym (produkcja kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger*) [24, 25]. Z kolei wytwarzanie gatunkowo specyficznych metabolitów przez drobnoustroje ma oczywiste i trudne do przecenienia znaczenie diagnostyczne.

Wysięk jest płynem zawierającym metabolity zarówno gospodarza, jak i mikroorganizmów wywołujących infekcję. Dlatego badanie jego składu metodami takimi jak NMR może pozwolić na stworzenie profilu metabolicznego, umożliwiającego identyfikację biomarkera zakażenia pochodzącego od danego gatunku patogenu lub charakterystycznej odpowiedzi organizmu na jego obecność. Jedne z pierwszych przeprowadzonych badań wstępnych w tym obszarze, mające na celu określenie profilu metabolicznego wysięków pochodzących z przewlekłych owrzodzeń goleni, pozwoliły na podstawie badań mikrobiologicznych określić rodzaje patogenów kolonizujących rany oraz dzięki analizie danych uzyskanych w badaniach NMR – ich profil metaboliczny. Dowiedziono, że w znacznej większości przypadków źródłami zakażenia były bakterie Gram-ujemne; 50% z wyizolowanych szczepów należało do rodziny *Enterobacteriaceae*, 22,5% do rodziny *Pseudomonadaceae* (a dokładniej *Pseudomonas aeruginosa*), 8,75% zidentyfikowanych mikroorganizmów stanowiło *Staphylococcus aureus*, a 5% – *Acinetobacter baumannii*. Warto zaznaczyć, że połowę populacji wyizolowanych mikroorganizmów stanowiły *Proteus mirabilis* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Badania spektrometryczne i ich analiza pozwoliły na wyróżnienie szeregu metabolitów, których obecność w wysięku może być ściśle związana z kontaminacją rany określonym rodzajem mikroorganizmu. Zastosowana metoda była na tyle dokładna, że pozwoliła nawet na określenie, który z pacjentów (mimo zaleceń lekarza prowadzącego) przemywał ranę wodą z mydłem [26].

Standardowa diagnostyka mikrobiologiczna nie daje możliwości szybkiego rozróżnienia czy zakażenie rany pochodzi od bakterii w formie biofilmowej czy planktonicznej. A wiedza ta jest niezwykle istotna przy doborze stosowanej terapii. Zważając na fakt, że tradycyjnie wykorzystywane środki antydrobnoustrojowe skierowane są przeciwko

- ! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

mikroorganizmom żyjącym w formie planktonicznej, charakterystyka metabolomiczna fenotypu biofilmu może pozwolić na rozwój nowych terapii.

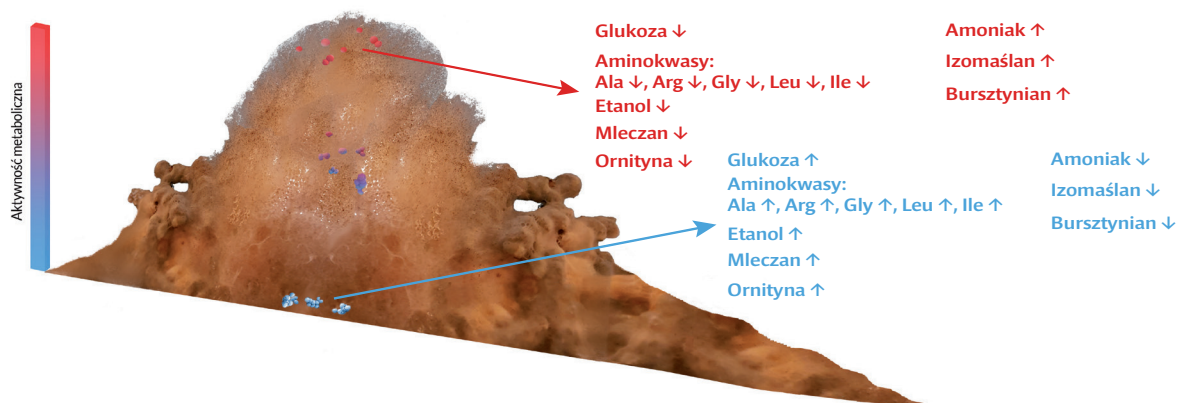
Badania proteomiczne oraz transkryptomiczne wskazują, że rodzaj metabolizmu patogenu zależny jest od jego formy bytowania (planktonicznej lub biofilmowej). Badania transkryptomiczne dowodzą, że szczep *S. aureus* w formie biofilmu żyje w warunkach mikroaerobowych lub beztlenowych [27, 28]. By to potwierdzić, wykonano analizy biochemiczne medium pochodzącego biofilmu szczepów UAMS-1 MSSA (ang. methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, gronkowiec złocisty metycylinowrażliwy) i UAMS-1182 MRSA (ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, gronkowiec złocisty metycylinooporny), oznaczając w nich poziom glukozy oraz związków organicznych będących produktami fermentacji (takich jak: kwas mlekowy, kwas octowy, kwas mrówkowy i acetoina). Zaobserwowano spadek poziomu glukozy i akumulację produktów fermentacji, co wskazuje, że aktywowany został szlak fermentacji, której produktem jest butanodiol. Ograniczoną dostępność tlenu sprawdzono również poprzez oznaczanie jego stężenia w medium hodowlanym. Jego zawartość spadała wraz z czasem dojrzewania biofilmu. Dane te wskazują, że zmniejszona dostępność tlenu powoduje zmianę metabolizmu drobnoustrojów żyjących w formie biofilmu na fermentacyjny [29].

Z wykorzystaniem spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR wykonano profile metaboliczne *S. aureus*, hodowanego w warunkach tlenowych oraz beztlenowych. Analiza pozwoliła określić zmiany zachodzące w metabolizmie, na podstawie produkowanych metabolitów zewnątrzkomórkowych oraz akumulacji składników medium hodowlanego (Ryc. 2) [30].

Różnice w metabolitach form planktonicznej i biofilmowej wykazano również w badaniach metabolicznych. Jedno z nich przeprowadzono na szczepach *S. aureus* MRSA i MSSA. Eksperyment opierał się na pomiarach  $^1\text{H}$  NMR metabolitów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. W analizie wykazano główne różnice w metabolizmie tych dwóch

form życia drobnoustrojów. Jedną z nich jest metabolizm aminokwasów. Zgodnie z dotychczas dostępną literaturą wskazano, że katabolizm argininy jest jednym z istotnych czynników w procesie powstawania i życia biofilmu [29–32]. Ponadto wykryto metabolity produkowane przez biofilm – takie jak: glicerol, gliceryna, malonian i propionian – związane z katabolizmem lipidów. Dodatkowo jeden z nich (malonian) był produktem degradacji pirymidyn u niektórych drobnoustrojów, między innymi u *S. aureus* [33]. Identyfikacja tego i innych metabolitów zaangażowanych w katabolizm puryn i pirymidyn świadczy o tym, że procesy te wspierają rozwój biofilmu, a powstające w nich metabolity mogą pozwolić rozróżnić biofilm od formy planktonicznej. W obecności glukozy komórki znajdujące się w formie biofilmowej przeprowadzają proces glikolizy, jednak w przypadku jej braku następuje zmiana i wykorzystywane są alternatywne źródła energii. Wykryta acetonina, będąca prekursorem 2,3-butanodiolu, stanowi potwierdzenie, że jego fermentacja staje się wówczas częścią ich metabolizmu [31].

Różnice w metabolitach formy planktonicznej i biofilmowej wykryto również u *Pseudomonas fluorescens* poddanego działaniu jonów miedzi, podczas wykonywania badania GC-MS oraz  $^1\text{H}$  NMR. Wykazano, że w formie planktonicznej komórki były narażone na stres oksydacyjny, na co wskazywały zmiany w cyklu TCA (ang. tricarboxylic acid cycle, zwany inaczej cyklem Krebsa), glikolizie, metabolizmie pirogronianu i nikotynamidu. W przypadku biofilmu zmiany metaboliczne zaszły w obrębie metabolizmu egozpolisacharydów, co świadczy o tym, że stres przyczynił się do reakcji obronnej [34]. Przy wykorzystaniu NMR stworzono również profile metaboliczne szczepu *A. baumannii* w formie planktonicznej i biofilmowej. Analiza porównawcza metabolitów wykazała podwyższone stężenie metabolitów (takich jak: octan, pirogronian, bursztynian w dojrzałym biofilmie), co wskazywało na zmniejszoną produkcję energii. Różnice widoczne były również w metabolitach związanych z metabolizmem nukleotydów. W biofilmie zaobserwowano



Ryc. 2. Schemat porównawczy przedstawiający różnice w metabolitach zewnątrzkomórkowych produkowanych przez bakterie w formie biofilmowej w zależności od ich aktywności metabolicznej. Opracowano na podstawie [30].

- ! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

podwyższony poziom UDP-glukozy (ang. uracil-diphosphate glucose), AMP (adenozyno-5'-monofosforan) i NAD<sup>+</sup> (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy). UDPG jest prekursorem polisacharydów, w tym egozpolisacharydu, a do ich syntezy niezbędny jest również P<sub>i</sub> (anion fosforanowy), co wyjaśnia podwyższoną ilość AMP, a dodatkowo potwierdza hipotezę, że metabolizm biofilmu skupiony jest wokół tworzenia macierzy ochronnej – EPS [35, 36].

Badania te dowodzą, że profil metaboliczny stworzony przy zastosowaniu spektroskopii NMR pozwala na rozróżnienie formy bytowania różnego rodzaju drobnoustrojów.

Znając biomarker świadczący o zakażeniu przez ściśle określony szczep lub grupę szczepów bakteryjnych, z zastosowaniem metod metabolomiki celowanej możliwe byłoby stworzenie testu diagnostycznego, pozwalającego określić rodzaj infekcji. Technika ta mogłaby stanowić uzupełnienie standardowych czasochłonnych metod diagnostyki mikrobiologicznej i umożliwić stałe monitorowanie stanu rany [37]. Jest to niezwykle ważne, gdyż w procesie kolonizacji rany krytyczną rolę odgrywają pierwsze 24 godziny od zakażenia [22]. Przekazanie próby pochodzącej od pacjenta do laboratorium NMR i jej analiza w tym czasie pozwoliłyby na szybkie zastosowanie terapii dostosowanej do rodzaju zakażenia i wpłynęły na znaczną poprawę rokowania chorego.

Źródłami zakażenia są często bakterie pochodzące z układu pokarmowego oraz naturalnego mikrobiomu skóry, w tym między innymi z rodzaju *Staphylococcus*. Sprawia to, że uniknięcie infekcji jest wyzwaniem dla lekarzy klinicystów, a sprofilowane, metabolomiczne badanie wysięku z rany mogłoby się stać istotnym narzędziem w ich ręku, służącym poprawie zdrowia i jakości życia pacjentów cierpiących z powodu ran przewlekłych.

KONFLIKT INTERESÓW: nie zgłoszono.

## PIŚMIENICTWO

- Ryan D, Robards K. Metabolomics: the greatest omics of them all? *Anal Chem* 2006;78(23):7954–7958.
- Wishart DS, Knox C, Guo AC et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D603–D610.
- International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431(7011):931–945.
- Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* 2007;8(9):1243–1266.
- Mapelli V, Olsson L, Nielsen J. Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. *Trends Biotechnol* 2008;26(9):490–497.
- Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabolomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007;2(11):2692–2703.
- Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev* 2011;40(1):387–426.
- Naylor S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3(5):525–529.
- Hulka BS, Wilcosky T. Biological markers in epidemiologic research. *Arch Environ Health* 1988;43(2):83–89.
- Krentz AJ, Hompesch M. Glucose: archetypal biomarker in diabetes diagnosis, clinical management and research. *Biomark Med* 2016;10.
- Linkov F, Yurkovetsky Z, Lokshin A. Hormones as biomarkers: practical guide to utilizing liminex technologies for biomarker research. *Methods Mol Biol* 2009;520:129–141.
- Posnett J, Franks PJ. The burden of chronic wounds in the UK. *Nurs Times* 2010;104(3):44–45.
- Augustin A, Maier K. Psychosomatic aspects of chronic wounds. *Dermatol Psychosom* 2003;4:5–13.
- Reiber GE, Boyko EJ, Smith DG. Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. *Low Extrem* 1995;2:409–428.
- Järbrink K, Ni G, Sönnergren H et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review. *Syst Rev* 2017;6:15.
- Jawień A, Bartoszewicz M, Przondo-Mordarska A et al. Wytyczne postępowania miejscowego i ogólnego w ranach objętych procesem infekcji. *Leczenie Ran* 2012;9(3):59–75.
- Anderson K, Hamm RL. Factors that impair wound healing. *J Am Coll Clin Wound Spec* 2014;4(4):84–91.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49–79.
- Wingender J, Strathmann M, Rode A, Leis A, Flemming HC. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol* 2001;336:302–314.
- Højby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35(4):322–332.
- Bjarnsholt T, Jensen PØ, Moser C, Højby N. *Biofilm Infections*. Springer-Verlag, 2011.
- Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G et al. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *J Wound Care* 2010;19(8):320–328.
- Cutting KF. Wound exudate: composition and functions. *Br J Community Nurs* 2003;8(Suppl. 9):S4–S9.
- Wendisch VF, Jorge JMP, Pérez-García F, Sgobba E. Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*. *World J Microbiol Biotechnol* 2016;32(6):105.
- Show PL, Oladele KO, Siew QY et al. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Front Life Sci* 2015;8:271–283.
- Junka A, Wojtowicz W, Ząbek A et al. Metabolic profiles of exudates from chronic leg ulcerations. *J Pharm Biomed Anal* 2017;137:13–22.
- Beenken KE, Dunman PM, McAleese F et al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2004;186:4665–4684.
- Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Go F, Götz F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(5):2663–2676.
- Zhu Y, Weiss EC, Otto M, Fey PD, Smeltzer MS, Somerville GA. *Staphylococcus aureus* biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. *Infect Immun* 2007;75(9):4219–4226.
- Sun JL, Zhang SK, Chen JY, Han BZ. Metabolic profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under aerobic and anaerobic conditions with 1H NMR-based nontargeted analysis. *Can J Microbiol* 2012;58(6):709–718.
- Ammons MCB, Tripet BP, Carlson RP et al. Quantitative NMR metabolite profiling of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* discriminates between biofilm and planktonic phenotypes. *J Proteome Res* 2014;13(6):2973–2985.
- Wu XH, Yu HL, Ba ZY, Chen JY, Sun HG, Han BZ. Sampling methods for NMR-based metabolomics of *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol J* 2010;5(1):75–84.
- Kim YS. Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application. *J Biochem Mol Biol* 2002;35(5):443–451.
- Booth SC, Workentine ML, Wen J et al. Differences in metabolism between the biofilm and planktonic response to metal stress. *J Proteome Res* 2011;10(7):3190–3199.
- Cabral MP, Soares NC, Aranda J et al. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism. *J Proteome Res* 2011;10(8):3399–3417.
- Yeom J, Shin JH, Yang JY, Kim J, Hwang GS. 1H NMR-based metabolite profiling of planktonic and biofilm cells in *Acinetobacter baumannii* 1656-2. *PLoS One* 2013;8(3):1–7.
- Baron S. *Medical Microbiology*. 4<sup>th</sup> edn. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, 1996.