

**Patryk KUROPKA**

Politechnika Wrocławska,
Wydział Chemiczny
e.mail:
patryk.kuropka@pwr.edu.pl

**Adrianna PYRA**

Politechnika Wrocławska,
Wydział Chemiczny

**Weronika ŁOJEWSKA**

Politechnika Wrocławska,
Wydział Chemiczny

**Wojciech WOJTOWICZ**

Politechnika Wrocławska,
Wydział Chemiczny

**Piotr MŁYNARZ**

Politechnika Wrocławska,
Wydział Chemiczny

Potencjał wykorzystania metabolomiki w badaniach przemysłowych

Potential of using metabolomics in industrial research

DOI: 10.15199/5.2024.1.3

Metabolomika, należąca do nauk omicznych, jest podejściem analitycznym służącym do określania zmian jakościowych i ilościowych w składzie próbki (metabolomu) przy pomocy zaawansowanych metod analitycznych, takich jak spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektrometria mas (MS) sprzężona z technikami separacyjnymi (np. LC-MS, GC-MS, CE-MS). Zebrane dane analityczne są analizowane za pomocą wielowymiarowych metod chemometrycznych oraz metod uczenia maszynowego. Ze względu na zdolność do wykrywania zmian w badanym materiale analitycznym powodowanych przez czynniki zarówno wewnętrzne jak i zewnętrzne, metabolomika wykazuje bardzo duży potencjał do wykorzystania w różnych gałęziach przemysłu, gdzie potrzebna jest powtarzalność procesów, dokładna analiza oraz autentykacja-uwierzytelnianie pochodzenia poszczególnych składników stosowanych w produkcji. Metabolomika może być stosowana w takich branżach przemysłowych jak przemysł spożywczy, biotechnologiczny, farmaceutyczny i kosmetyczny. Doskonale może sprawdzać się w medycynie do wyznaczania nowych celów terapeutycznych, pozwala na monitorowanie terapii oraz rozwoju stanów patologicznych. W toksykologii środowiskowej umożliwia określanie zmian w metabolomie organizmów po ekspozycji na dany stresor oraz zmiany środowiskowe. W opracowaniu przedstawiono przykłady aktualnych i potencjalnych zastosowań metabolomiki w różnych gałęziach przemysłu.

Słowa kluczowe: metabolomika, przemysł, biotechnologia, NMR, LC-MS

Metabolomics, a field within omics sciences, is an analytical approach used to determine qualitative and quantitative changes in the composition of a sample (metabolome) using advanced analytical methods such as nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and mass spectrometry (MS) coupled with separation techniques (e.g., LC-MS, GC-MS, CE-MS). The collected analytical data are analyzed using multidimensional chemometric methods and machine learning techniques. Due to its ability to detect changes in the analyzed material caused by both internal and external factors, metabolomics has great potential for use in various industries where process repeatability, precise analysis, and authentication of the origin of individual components used in production are needed. Metabolomics can be applied in industries such as food, biotechnology, pharmaceuticals, and cosmetics. It can also be valuable in medicine for identifying new therapeutic targets, monitoring therapy, and the development of pathological conditions. In environmental toxicology, it enables the determination of changes in the organism's metabolome after exposure to a specific stressor and environmental changes. This paper presents examples of current and potential applications of metabolomics in various industries.

Keywords: Metabolomics, Industry, Biotechnology, NMR, LC-MS

Wprowadzenie

Postępujący rozwój technologiczny znacząco wpływa na przemysł, poprzez stawianie coraz to nowych wymagań jakościowych odnośnie wytwarzanych produktów. Zaawansowane techniki analityczne, pierwotnie wykorzystywane głównie do celów naukowo-badawczych, obecnie znajdują zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Rozwój metod analityki chemicznej niewątpliwie zwiększa ich wykorzystanie, co jednocześnie sprawia, że są one coraz częściej stosowane w przedsiębiorstwach. Metabolomika stanowi szczególne podejście do analityki chemicznej, które po raz pierwszy było zaproponowane ok. 25 lat temu [1]. Jest to nauka wchodząca w skład tak zwanych metod omicznych, do których należy również genomika (analiza całego genomu), transkryptomika (badanie eks-

presji genów) i proteomika (analiza kompletnego zestawu białek – proteomu). Wszystkie te techniki reprezentują systemowe podejście do analizy układów i próbek biologicznych [2].

Obecnie metabolomika umożliwia szybkie, dokładne i szczegółowe określenie stanu fizjologicznego oraz procesów molekularnych zachodzących w układach i próbkach biologicznych. Skutecznie wykorzystywana jest do analizy komórek, tkanek, płynów biologicznych oraz całych organizmów, w tym ssaków [5], roślin [6–8] i mikroorganizmów [9]. W wielu dziedzinach przemysłu, zwłaszcza związanych z biotechnologią, istnieje silne zainteresowanie procesami biochemicznymi i różnicami w składzie próbek biologicznych. Dotyczy to takich obszarów jak produkcja żywności, ocena jej jakości i wydajności produkcji, spersonalizowana medycyna, produkcja farmaceutyków oraz analiza wpływu przemysłu na środowisko (rys. 1).



Rys. 1. Wybrane przykłady praktycznego zastosowania metabolomiki

Artykuł ma na celu podsumowanie wybranych potencjalnych i aktualnych zastosowań metabolomiki w różnych obszarach przemysłowych.

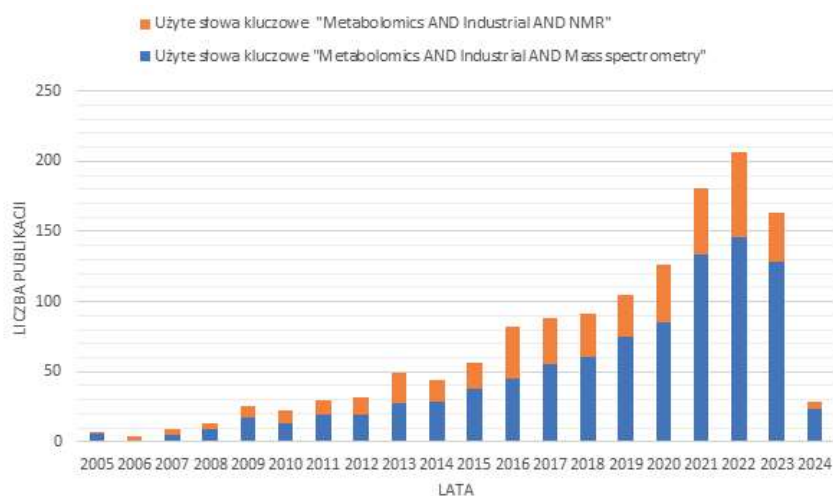
Zastosowanie metod analitycznych w metabolomice

Najczęściej stosowaną metodą analityczną w metabolomice jest spektrometria mas MS (*mass spectrometry*) sprzężona z chromatografią cieczą LC-MS (*liquid chromatography-mass spectrometry*), gazową GC-MS (*gas chromatography-mass spectrometry*) lub elektroforezą kapilarną CE-MS (*capillary electrophoresis-mass spectrometry*), a także spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego NMR (*nuclear magnetic resonance*) (rys. 2) [3].

Spektrometria mas charakteryzuje się niezwykle wysoką czułością metody. Za jej pomocą można oznaczać stężenia substancji nawet w przedziałach femtomolowych, jednak najczęściej w badaniach metabolomicznych, w praktyce oznacza się stężenia mikro- i nanomolowe. W szczególności na uwagę zasługuje wysokorozdzielcza

spektrometria mas HRAM-MS (*high resolution accurate mass – mass spectrometry*), która pozwala wyznaczać stosunek masy do ładunku m/z zarówno z wysoką dokładnością (błąd pomiaru <1 ppm (*parts per million*)), jak i z wysoką rozdzielczością umożliwiającą rozróżnianie metabolitów na podstawie nawet tysięcznych części jednostki masy atomowej. Taka precyzja widm MS pozwala na dokładne wyznaczenie wzoru sumarycznego substancji, co znacząco zawęża możliwe identyfikacje. Równocześnie eksperymenty z wykorzystaniem techniki fragmentacji jonów (MS/MS) pozwalają często na jednoznaczную identyfikację badanych substancji [10]. Oznaczanie danej grupy związków za pomocą metody LC-MS wymaga dopracowania zarówno odpowiedniej procedury przygotowania próbki oraz doboru wielu zmiennych analizy, które w znacznym stopniu wpływają na uzyskiwane wyniki, w tym dobór kolumny chromatograficznej (np. typu HILIC, RP-C18 etc.), eluentów wraz z dodatkami (np. metanol, acetonitryl, woda, sole buforujące), parametrów chromatograficznych (np. przepływ, gradient, temperatura), a także rodzaju i parametrów źródła jonów, typu eksperymentu pomiarowego i innych [11]. Dobór odpowiedniego układu tych wszystkich parametrów może pozwolić na bardzo szerokie pokrycie analityczne danej próbki z detekcją zarówno związków polarnych jak i niepolarnych. Zastosowanie kilku różnych wariantów rozdziału takich jak GC-MS, LC-MS i CE-MS może działać komplementarnie i pozwolić na kompleksową charakterystykę molekularną badanego materiału. Pomiar wykonywany za pomocą spektrometrii mas często wymagają tzw. standardów wewnętrznych i/lub bardzo dobrze opracowanych baz danych zawierających biblioteki autentycznych referencyjnych widm związków oraz tych generowanych *in silico* [12]. Specjalistyczne oprogramowanie pozwala na wykonywanie celowanej analizy znanych i poszukiwanych w próbce badanych substancji. W analizie niecelowanej bierze się pod uwagę odpowiedni profil-układ sygnałów (cech), który charakteryzuje skład molekularny danej próbki. Podejście to należy do tzw. ślepych analiz (*blind analysis*) i bazuje na podobieństwach pomiędzy określonymi profilami sygnałów pochodzących od danych próbek. Metoda ta jest w szczególności przydatna jako metoda przesiewowa dla porównywania jakości surowców i półproduktów, powtarzalności produkcji (optymalizacji procesów) oraz kontroli produktu końcowego [13].

Następną metodą powszechnie wykorzystywaną w metabolomice jest spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego NMR. Cechuje się ona dużą zdolnością do identyfikacji struktur związków oraz wysoką powtarzalnością. Są to niewątpliwie zalety tej metody, za pomocą której można w sposób jednoznaczny przypisać strukturę badanych związków na podstawie wielu widm jednowymiarowych lub dwuwymiarowych. W analizie strukturalnej analizowanych związków chemicznych niezwykle użyteczne są również komercyjne bazy danych takie jak np. CHENOMX [14], które zawierają referencyjne zestawy widm najczęściej występujących metabolitów. Nieocenione są również własne bazy danych, które w znaczny sposób wspomagają identyfikację sygnałów NMR. Wykorzystanie bibliotek referencyjnych jest możliwe głównie dzięki dużej powtarzalności pomiarów, co jest głównym atutem tej metody. Oczywiście wraz z rosnącym natężeniem pola/częstotliwością aparatów rośnie rozdzielczość widm, a z rozwojem sond pomiarowych, czułość pomiarów. Niestety ciągle barierą do rutynowego wykorzystania w przemyśle tej metody jest cena aparatów NMR,



Rys. 2. Trendy w liczbie publikacji zawierających słowa kluczowe „metabolomics; industrial; NMR/Mass Spectrometry” Dane pozyskane z bazy Web of Science wyszukując zadane frazy w tytułach, abstraktach i słowach kluczowych w artykułach opublikowanych do pierwszego kwartału 2024 r.

choć wykonanie pomiarów przez wyspecjalizowane jednostki jest relatywnie tanie. W ostatnim czasie pojawiły się również na rynku małe niskobudżetowe aparaty NMR typu *benchtop*, które wydają się być niezwykle przydatne w analizie niecelowanej [15]. Spektroskopia NMR pozwala na analizę związków polarnych i niepolarnych, w zależności od wykonanej ekstrakcji metabolitów oraz użytego odczynnika deuterowanego. Najbardziej popularnymi odczynnikami są woda deuterowana D_2O , deuterowany metanol CD_3OD oraz deuterowany chloroform $CDCl_3$. W przypadku D_2O do wykonania pomiaru wystarczy zastosowanie ok. 10-proc. roztworu D_2O w H_2O , co w znaczny sposób obniża koszty analizy. Na powtarzalność spektroskopii NMR korzystnie wpływa również opracowanie standardowych procedur pomiarowych wraz z opracowaniem własnych parametrów w zależności od analizowanej próbki [16]. Wszystkie te czynniki wpływają na wysoką odtwarzalność wykonywanych pomiarów i jest to główny argument przewagi spektroskopii NMR nad spektrometrią mas. W przeciwieństwie jednak do jakiegokolwiek analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas, poziom detekcji badanych metabolitów jest znacznie słabszy i sięga ok. 0,05 mM, w zależności od ilości skanów pomiarowych (czasu pomiaru). Kolejną cechą spektroskopii NMR jest możliwość zastosowania rozdzielania, „odfiltrowania” związków niskocząsteczkowych od makromolekuł za pomocą odpowiedniego programu (sekwencji pulsów), tym samym znacząco usprawniając badanie metabolitów w złożonych matrycach.

Jak wynika z przedstawionych informacji najlepszym podejściem metabolomicznym powinno być równoczesne wykorzystanie zarówno spektrometrii mas jak i spektroskopii NMR do analizy tych samych próbek. Równoczesna, wieloplatformowa analiza może być skutecznie wykorzystywana, tworząc wysoko komplementarne narzędzia dla jak największego pokrycia analitycznego badanego materiału.

W obu opisanych metodach kluczowym aspektem jest zaplanowanie odpowiedniego eksperymentu pomiarowego DoE (*design of experiment*) wraz z odpowiednim przygotowaniem badanych próbek [17]. Od tej procedury preanalitycznej w znacznej mierze zależy cała dalsza analiza oraz otrzymane wyniki badań. W każdym pomiarach kluczowym etapem przygotowania próbki jest ekstrakcja metabolitów. Do ekstrakcji związków polarnych najczęściej używane są organiczne rozpuszczalniki polarne typu metanol lub acetonitryl. Do równoczesnej ekstrakcji i rozdzielenia związków polarnych i niepolarnych stosuje się m.in. metodę Folcha (chloroform:metanol:woda; 8:4:3 v/v/v); metodę Bligha i Dyer (chloroform:metanol:woda; 2:2:1.8 v/v/v) oraz ekstrakcję z udziałem MTBE eteru *tert*-butylowo-metylowego [18]. W spektroskopii NMR można również wykonać ekstrakcję związków polarnych bezpośrednio do buforu fosforanowego, co w znacznym stopniu upraszcza proces przygotowania próbki i pozwala na jej bezpośrednią analizę po odwirowaniu. Dodatkowe techniki przygotowania próbki w tym ekstrakcja do fazy stałej SPE (*solid phase extraction*), fazy ciekłej LLE (*liquid liquid extraction*) mogą umożliwić analizę różnorodnego materiału analitycznego głównie za pomocą spektrometrii mas w zależności od złożoności i charakterystyki matryc, które są spotykane w rozmaitych gałęziach przemysłu.

Analiza danych w metabolomice

Wynikiem pomiarów analitycznych niezależnie od wybranej metody są złożone zestawy danych, które do wyekstrahowania zawartych w nich informacji, wymagają podstawowych metod sta-

tystycznych jak i zaawansowanych metod obliczeniowych wchodzących w skład chemometrii, lub też szeroko pojętego uczenia maszynowego. Metody te są w szczególności kluczowe w analizach szeroko-przepustowych, gdzie finalnym produktem są obszerne zbiory danych tzw. *big data*. Metody chemometryczne umożliwiają na podstawie wielu zmiennych (nawet setek tysięcy) wybranie tych znaczących, które w znaczny sposób różnicują poszczególne obserwacje (próbki). W zależności od pierwotnego eksperymentu, narzędzia chemometryczne umożliwiają tworzenie modeli kalibracyjnych, dyskryminacyjnych, klasyfikacyjnych, regresyjnych czy po prostu redukcji wymiarowości. Mnogość dostępnych metod jest znacząca, jednak istnieją rozwiązania, które w metabolomice i przemyśle są preferowane. Stąd też szerokie zastosowanie znalazły metody eksploracji danych, które umożliwiają redukcję ich wymiarowości lub/i nienadzorowane grupowanie obserwacji. Do tej grupy, zaliczane są metody takie jak analiza głównych składowych PCA (*principal component analysis*), grupowa hierarchiczna (*Hierarchical clustering*) i UMAP (*uniform manifold approximation and projection*) pozwalające na prostsze kolejne etapy modelowania, lub też łatwiejszą reprezentację zmienności w analizowanym zbiorze [19–21].

Istotnym elementem prowadzonych analiz metabolomicznych jest możliwość jednoznacznego wytłumaczenia uzyskiwanych modeli. W metodach uczenia maszynowego pojawia się kompromis między dokładnością, a interpretowalnością modelu [22, 23]. Niejednokrotnie wraz ze wzrostem dokładności predykcji modelu, zmniejsza się jego możliwość prostej interpretacji, czyli wpływu poszczególnych zmiennych na końcowy wynik. W związku z tym w metabolomice preferowane są modele z bezpośrednią możliwością zrozumienia wpływu zmiennych na ostateczny wynik. Do tej grupy zaliczane są głównie metody regresyjne np. dyskryminacyjna analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów PLS-DA (*partial least square – discriminant analysis*) oraz jej ortogonalnej wersji OPLS-DA (*orthogonal partial least square – discriminant analysis*), regresja grzbietowa (*ridge regression*), regresja LASSO (*least absolute shrinkage and selection operator*) i regresja logistyczna (*logistic regression*) [24–28]. Dodatkowo przy interpretacji wyników zastosowanie znalazły takie rozwiązania jak wielowymiarowa dekonwolucja krzywych w metodzie naprzemiennych najmniejszych kwadratów MCR-ALS (*multivariate curve resolution-alternating least squares*) pozwalająca na monitorowanie przebiegu reakcji, ułatwiająca przy tym zrozumienie procesów technologicznych [29].

W przypadku innych metod uczenia maszynowego, pomimo możliwości uzyskania lepszej dokładności predykcji obserwacji, jak np. w przypadku zastosowania maszyn wektorów nośnych SVM (*support vector machines*) lub sieci neuronowych (*artificial neural network*) bezpośrednia interpretacja jest obecnie niemożliwa przy bardziej skomplikowanych modelach [30, 31]. Metody te uważane są za tzw. czarne skrzynki (*blackbox*), a do ich wytłumaczenia konieczne jest wykorzystanie dodatkowych metod aproksymacji dla poszczególnych predykcji np. LIME (*local interpretable model-agnostic explanations*) i SHAP (*shapley additive explanations*) [32, 33], prowadząc tym samym do ich ciągle ograniczonego wykorzystania w różnych gałęziach przemysłu, gdzie interpretacja jest kluczowa.

Przykłady zastosowania metabolomiki w różnych gałęziach przemysłu

Jak wynika z przeprowadzonej analizy bazy danych WoS (*Web of Science*), metabolomika w przemyśle zyskała w ostatnich latach

dość duże znaczenie, w szczególności z wykorzystaniem spektrometrii mas z rosnącym udziałem spektroskopii NMR (Rys. 2). Spośród licznych przykładów zastosowania opisywanej metodyki analiz próbek, zestawiono tabelarycznie (Tab. 1) oraz przedstawiono w sposób opisowy (*vide infra*) wybrane przykłady wykorzystania metabolomiki w wybranych gałęziach przemysłu.

Przemysł żywnościowy i nowoczesne rolnictwo

W branży spożywczej metabolomika zaczyna znajdować zastosowanie zarówno w procesach produkcji, gdzie stanowi sposób oceny jakości pierwotnych składników, jak i w późniejszych etapach produkcji, na przykład do badania wpływu poszczególnych procesów produkcyjnych na jakość, właściwości oraz bezpieczeństwo produktów [34]. Dodatkowo, w badanych wyrobach spożywczych możliwe jest identyfikowanie i oznaczanie wielu związków z równoczesnym powiązaniem ich obecności na właściwości smakowe i zdrowotne. Monitorowanie zmian w metabolomie produktów pod wpływem różnych czynników, takich jak dobór odpowiednich gatunków lub odmian roślin, zmiana warunków środowiskowych, dobór metod przetwarzania oraz przechowywania, pozwala na optymalizację procesów, a także ocenę bezpieczeństwa i jakości ostatecznego artykułu spożywczego [34–36]. Dla przykładu, metabolomika umożliwia ocenę wpływu kolejności etapów obróbki cieplnej i mechanicznej na profil fitoskładników przecierów warzywnych [37]. Wykazano, że mieszanie próbek przed ogrzewaniem powoduje znaczne obniżenie poziomów witaminy C oraz glutationu, wraz z równoczesnym zwiększeniem poziomów utlenionych kwasów tłuszczowych i substancji lotnych (powstałych w wyniku utleniania lipidów). Z tego względu przeprowadzone badania wykazały, że proces ten powoduje większy stopień utlenienia pożywienia, a przetwarzanie surowych warzyw na tzw. *puree* może mieć duży wpływ na skład fitochemiczny produktu, głównie ze względu na aktywację różnych endogennych enzymów podczas procesów ogrzewania i mieszania. Dodatkowo, obserwowana zmienność profili metabolicznych przecierów uzyskiwanych po powtarzanych, jednakowych procesach z użyciem tego samego materiału wejściowego wskazuje, że metabolomika może pomóc w optymalizacji procesów przetwarzania tego surowca spożywczego, w celu uzyskiwania produktów o stałym, optymalnym składzie i jakości [36, 37]. Proces przetwarzania surowców spożywczych nie jest jedynym czynnikiem, który bezpośrednio wpływa na ich jakość. Istotny wpływ mają również czynniki środowiskowe, w tym pochodzenie geograficzne produktu, oraz panujące w miejscu zbioru warunki klimatyczne. Określenie pochodzenia na podstawie samego wyglądu lub prostej analizy chemicznej jest często bardzo trudne lub niemożliwe. Fakt ten może stwarzać istotny problem zarówno dla konsumentów, jak i producentów, jakim może być celowe fałszowanie produktów tańszymi i często gorszymi zamiennikami, lub zakłamywanie informacji o faktycznym ich źródle pochodzenia. Metabolomika skutecznie wykorzystywana jest do profilowania i ustalania pochodzenia poszczególnych produktów spożywczych w celu wykrycia prób fałszerstwa [38, 39]. Na przykład, technika NMR została zastosowana do wykrywania sztucznych barwników w szafranie, jednej z najdroższych przypraw na świecie [40]. Niecelowana analiza metabolomiczna, wykorzystująca technikę LC-MS, pozwoliła na identyfikację markerów świadczących zarówno o autentyczności, jak i pochodzeniu geograficznym tej przyprawy [41]. Również produkty o złożonym składzie i szerokiej charakterystyce mogą być poddawane analizie w celu ustalania ich pochodzenia. Spektroskopia NMR została wykorzystana do opracowania profili chemicznych polskich miodów i identyfikacji markerów chemicznych charakterystycznych dla poszczególnych rodzajów [17].

Kolejnym istotnym kierunkiem rozwoju w branży spożywczej jest poszukiwanie nowych, obiecujących naturalnych produktów spożywczych, stanowiących alternatywę dla konwencjonalnych składników odżywczych, jednocześnie spełniających coraz większe oczekiwania konsumentów pod względem ich właściwości oraz warunków ekologicznych. Dla przykładu, produkty takie jak algi morskie zostały zbadane pod kątem składu, zwłaszcza obecności nowych bioaktywnych metabolitów o unikalnych właściwościach odżywczych, co pozwala na ich wykorzystanie jako nutraceutyków [42]. Metabolomika może również znaleźć zastosowanie w ocenie jakości i bezpieczeństwa w rozwijającej się, względnie nowej dziedzinie produktów spożywczych z wykorzystaniem owadów jadalnych [43]. Kolejnym obszarem intensywnego rozwoju jest uprawa konopi siewnej, zawierającej wiele bioaktywnych związków z grupy fitokannabinoidów. Pomimo kontrowersji, coraz częściej są one wykorzystywane w branży spożywczej, rolniczej, kosmetycznej oraz medycznej. Zróżnicowanie odmian i bogactwo składu metabolitów pierwotnych i wtórnych czynią metabolomikę idealnym narzędziem do chemotaksonomii, oceny ryzyka i optymalizacji plonów w celu uzyskania produktów o pożądanym profilu związków bioaktywnych [7, 44]. Równocześnie, prowadzone badania mogą być skutecznie wykorzystane do profilowania roślin w kontekście poszukiwania potencjalnych terapeutyków, które mogą być stosowane w branży farmaceutycznej [8].

Przemysł farmaceutyczny i medycyna

Przemysł farmaceutyczny stanowi obecnie jeden z najszybciej rozwijających się sektorów na świecie. Wraz ze wzrostem kosztów związanych z poszukiwaniem, opracowywaniem i wdrażaniem nowych leków, rośnie potrzeba wykorzystywania wysokowydajnych technik analitycznych zdolnych do przeniesienia nacisku badań farmaceutycznych z celowanego odkrywania indywidualnych celów molekularnych na bardziej kompleksowe podejście systemowe, traktujące schorzenia jako modele sieci metabolicznych [45]. Metabolomika, badając metaboliczny fenotyp, bezpośrednio odzwierciedla zmiany zachodzące w organizmie w danym momencie, wynikające zarówno z procesu patofizjologicznego, jak i odpowiedzi na potencjalnie trwającą terapię. Z tego powodu farmakometabolomika może stanowić cenne narzędzie na każdym etapie opracowywania leku: od odkrywania i poszukiwania związków o potencjał leczniczym, poprzez wczesne fazy rozwoju leku, ocenę i badania kliniczne, aż po monitorowanie wdrażanych terapii. Współczesne trendy w farmacji obejmują wielokierunkowe dostosowanie farmakoterapii do indywidualnych potrzeb pacjenta, wykorzystując np. ingerencję w mikroflorę jelitową w celu sterowania biodostępnością i biotransformacją terapeutyków [45–47]. Dodatkowo, integracja metabolomiki z innymi technikami omicznymi, takimi jak genomika, i transkryptomika, pozwala na opracowywanie i wdrażanie precyzyjnych terapii dostosowanych do indywidualnych potrzeb, zwiększając pewność i skuteczność leczenia [45].

Jedną z kluczowych funkcji metabolomiki w medycynie oraz w przemyśle farmaceutycznym jest powiązanie zmian biochemicznych wraz ze zmianami zachodzącymi w organizmach pod wpływem substancji czynnych podczas leczenia. Badania tego rodzaju są wykorzystywane przede wszystkim na przedklinicznych etapach opracowywania leków, zwłaszcza w badaniach toksykologicznych, farmakodynamicznych i farmakokinetycznych [45, 46]. Analiza zmian w metabolomie pod wpływem aktywnej substancji, zarówno w badaniach *in vivo*, jak i *in vitro*, umożliwia ocenę skuteczności oraz bezpieczeństwa leku, a także wykrycie potencjalnych efektów ubocznych [48].

Tabela 1. Przykłady praktycznego zastosowania metabolomiki w wybranych obszarach zainteresowań przemysłu obrazujące potencjał i korzyści wynikające z tego typu badań

Obszar zainteresowania	Zastosowane podejście analityczne	Oznaczone grupy związków	Przedmiot badań	Cel badań	Rezultat badań
Branża farmaceutyczna	Niecelowana analiza UHPLC-FIE-HRMS; GC-TOF-MS	Kwasy tłuszczowe, aminokwasy, kwasy organiczne, nukleotydy, węglowodany	Szczep bakteryjny <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Badanie mechanizmu działania obiecującego leku przeciwgruźlicowego – pretomanidu.	Wykazano różnice w profilu metabolicznym po stosowaniu pretomanidu oraz innych antybiotyków, określono szlaki ulegające zmianom pod wpływem pretomanidu. Leczenie pretomanidem generuje unikalny profil metabolitów w porównaniu z innymi antybiotykami [59].
Branża kosmetyczna	Niecelowana analiza ¹ H NMR; UHPLC-QTOF/MS; UHPLC-Q-Orbitrap/MS	Aminokwasy, nukleotydy, węglowodany	Wpływ składnika kosmetycznego, DIV665, z referencyjnym związkiem o podobnej strukturze, PA102 na metabolizm tkankowych i komórkowych modeli skóry i wątroby <i>in vitro</i>	Ocena bezpieczeństwa potencjalnego kosmetyku poprzez porównanie działania DIV665, który był badany tylko za pomocą testów <i>in vitro</i> , a PA102, który był wcześniej badany za pomocą tradycyjnych metod toksyczności <i>in vivo</i> .	Składniki wykazały podobną penetrację modeli skóry, podobny metabolizm w modelach skóry i wątroby oraz niewielkie różnice w powodowanych zmianach w metabolomie komórek skóry i wątroby. Wnioski sugerują, że PA102 jest biologicznie podobny do DIV665, co umożliwia przewidywanie niskiej toksyczności skóry i układowej dla DIV665 na podstawie danych dotyczących PA102 [60].
Żywność alternatywna	Analiza celowana i niecelowana UHPLC-Q-Orbitrap/MS	Aminokwasy, kwasy tłuszczowe, lipidy, kwasy organiczne, nukleozydy, nukleotydy, peptydy, węglowodany	Mikroalgi, hodowane w przemysłowych fotobioreaktorach	Zbadanie potencjału trzech gatunków mikroalg (<i>Tetradismus obliquus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> i <i>Nannochloropsis oceanica</i>) jako alternatywnego źródła pożywienia dla psów.	Mikroalgi wykazały potencjał jako cenne źródła składników odżywczych dla psów, przewyższając ich wymagania w niezbędnych aminokwasach, choć niektóre gatunki nie zawierały niektórych kwasów tłuszczowych. Analiza wskazała na różnice w zawartości glikolipidów, glicerolipidów i fosfolipidów. Ogólnie, wyniki sugerują, że mikroalgi mogą być wartościowym źródłem pożywienia dla psów [61]
Przemysł spożywczy	Analiza niecelowana ¹ H NMR i ¹ H-(¹³ C) NMR	Kwasy organiczne, aminokwasy, sacharydy, etanol	Soki cytrusowe	Objektem badań było zastosowanie spektroskopii NMR w połączeniu z analizą chemometryczną do badania profilu metabolicznego soków cytrusowych z Kalabrii oraz ocena zmian w składzie i profilu metabolicznym soków podczas procesów przetwarzania wykorzystywanych w przemyśle.	Wykazano różnice w profilach metabolicznych soków świeżego, pasteryzowanego i zagęszczonego. Szczególnie wyraźne zmiany zostały zaobserwowane dla lotnych związków organicznych [62].
Rolnictwo	Analiza celowana i niecelowana UHPLC-Q-Orbitrap/MS	Pestycydy, lipidy, kwasy organiczne, aminokwasy, przeciwutleniacze	Owoce ogórka	Określenie wpływu stosowania pestycydów i nawozów dolistnych na metabolizm owoców ogórka.	Wykazano, że stosowanie mieszanki pestycydów i nawozów dolistnych poprawia zawartość kwasów organicznych i poziom przeciwutleniaczy w owocach ogórka, regulując jednocześnie szlaki metaboliczne i promując rozpad pestycydów [63].
Biotechnologia	Analiza celowana GC-MS	Lipidy, kwasy organiczne	<i>Parachlorella kessleri</i> , jednokomórkowa zielona alga morska	Badanie metabolicznych profili w celu wyjaśnienia mechanizmów fizjologicznych akumulacji lipidów w mikroalgach w warunkach niedostatku substancji odżywczych.	Analiza metabolomiczna w <i>P. kessleri</i> pozwoliła zidentyfikować istotne metabolity zaangażowane w biosyntezę i degradację prekursorów lipidów, co może mieć potencjał w produkcji biopaliw [64].
Ekologia	Analiza celowana UHPLC-QQQ/MS	Aminokwasy, kwasy organiczne, nukleozydy, nukleotydy, poliaminy	Organizm słodkowodny <i>Daphnia magna</i> narażony na działanie zanieczyszczeń pochodzących z oczyszczalni ścieków oraz sektorów przemysłowych	Ocena efektów antropogenicznej działalności jako źródła zanieczyszczeń wodnych na organizmy słodkowodne. Zbadanie zakłóceń na poziomie molekularnym w profilu metabolicznym <i>Daphnia magna</i> spowodowanych działaniem zanieczyszczeń.	Wykazano istotne zakłócenia w profilu metabolicznym <i>Daphnia magna</i> po ekspozycji na próbki zanieczyszczeń, wskazując na stres oksydacyjny, zaburzenia metabolizmu energetycznego i dysregulację białek. Wyniki dowodzą przydatności metabolomiki środowiskowej do charakteryzowania zakłóceń na poziomie molekularnym u organizmów wodnych narażonych na mieszaniny chemiczne [65].

Metabolomika oferuje możliwość głębszego zrozumienia patofizjologii poszczególnych schorzeń na poziomie molekularnym oraz zmian w metabolizmie na różnych etapach ich rozwoju pod wpływem wdrażanej terapii. Poszerzenie wiedzy na temat złożoności i różnorodności metabolizmu komórek, tkanek, narządów i organizmu chorobowo zmienionego prowadzi do skuteczniejszego projektowania nowych celów terapeutycznych oraz bardziej efektywnej diagnostyki chorób na wczesnych etapach ich rozwoju [3, 48–50]. W ramach tego podejścia, metabolomika odgrywa w onkologii szczególnie ważną rolę, umożliwiając profilowanie metabolomiczne komórek i tkanek nowotworowych. Komórki nowotworowe charakteryzują się znacznie zmienionym metabolizmem, wykazując wysokie zapotrzebowanie energetyczne, utratę funkcji regulatorowych oraz intensywną proliferację. Pomimo pewnych wspólnych cech, nowotwory wykazują dużą heterogenność i zróżnicowanie w odpowiedzi na terapię, nawet u pacjentów o zbliżonym fenotypie [3, 51]. Metabolomika stwarza możliwości precyzyjnego określenia profili metabolicznych komórek nowotworowych, co może przekładać się na planowanie skuteczniejszego leczenia. Ponadto pozwala na monitorowanie zmian w odpowiedzi na chemioterapię. Integracja metabolomiki z innymi technikami "omicznymi" pozwala na skuteczną i spersonalizowaną terapię, co jest istotne zarówno z perspektywy pacjenta, jak i przemysłu farmaceutycznego, umożliwiając rozwój różnego rodzaju terapii celowanych [51, 52].

Wpływ przemysłu na środowisko

Wpływ przemysłu na środowisko staje się coraz bardziej istotnym aspektem, zwłaszcza w kontekście dużego popytu konsumenckiego. Niestety rozwój przemysłowy może także generować zmiany w ekosystemach, zarówno na skutek celowego wprowadzania substancji (np. stosowanie nawozów) jak i niezamierzonej emisji zanieczyszczeń. Nauki o otaczającym nas środowisku coraz częściej korzystają z metabolomiki w celu wykrywania zmian w metabolomie organizmów po ekspozycji na stresory środowiskowe zarówno u ludzi, zwierząt, roślin, jak i mikroorganizmów [9, 53, 54]. W związku z ciągłym wprowadzaniem nowych substancji w produktach konsumenckich i przemysłowych, konieczne staje się ich ocenianie pod kątem potencjalnego zagrożenia dla zdrowia ludzkiego oraz wpływu na środowisko. Ocena ta musi uwzględniać wszystkie etapy cyklu życia produktu, obejmujące produkcję, użytkowanie, przetwarzanie oraz utylizację [55]. Konwencjonalne techniki, ze względu na złożoność substancji i zmienność w ekosystemach, są niewydajne i kosztowne w skutecznym zastosowaniu do oceny ryzyka i badań toksykologicznych. Dodatkowo, praktyki badawcze na zwierzętach, stosowane w przeszłości do oceny toksyczności, są obecnie uznawane za nieetyczne, stąd istnieje potrzeba poszukiwania lepszych alternatyw. Obiecujące wydaje się wykorzystanie metabolomiki w połączeniu z nowoczesnymi technikami biotechnologicznymi do opracowania nowoczesnych testów *in vitro*. Rozwój hodowli komórkowych, zwłaszcza zaawansowanych trójwymiarowych hodowli komórkowych, takich jak organoidy, pozwala na tworzenie adekwatnych fizjologicznie modeli do badań zarówno ostrej, jak i przewlekłej odpowiedzi na obecność danej substancji. Takie podejście stanowi obiecującą strategię badań ryzyka, a uzyskane modele odpowiedzi na konkretne czynniki mogą być wykorzystywane przez organy decyzyjne w ochronie środowiska i kontroli przemysłowej [54, 56]. Metabolomika środowiskowa wnosi istotny wkład w badania oraz regulacje dotyczące powszechnie stosowanych substancji chemicznych w przemyśle. Przykładem może być badanie wpływu powszechnie stosowanego kiedyś surfaktantu, kwasu perfluorooktanowego (PFOA), na środowisko. Model roślinny

w postaci ogórka siewnego został wykorzystany do przeprowadzenia metabolomicznej analizy wpływu PFOA na uprawę. Badanie wykazało, że obecność PFOA w glebie spowodowała toksyczne objawy i znaczne zahamowanie wzrostu ogórka. Analiza metabolomiczna ujawniła, że stres związany z PFOA prowadził do hamowania fotosyntezy, aktywacji przeciwutleniaczy fenolowych i blokowania metabolizmu naturalnych aminokwasów. Otrzymane wyniki dostarczają wartościowych informacji na temat mechanizmu molekularnego stresu abiotycznego na rośliny, potwierdzając jednocześnie ryzyko toksyczności PFOA dla środowiska [57].

Metabolomika środowiskowa pozwala także na badanie wpływu zmian klimatu i warunków środowiskowych na wydajność i jakość upraw [53]. Przykładowo, zastosowanie metabolomiki umożliwiło zbadanie wpływu stresu suszy na soję, celem zrozumienia mechanizmów jej tolerancji na suszę. Wyniki analizy wykazały, że odporność jednego z gatunków opiera się na akumulacji wyższych poziomów substancji regulujących osmozę, takich jak rozpuszczalne cukry, w tym mannoza i ksyloza, aminokwasy prolina i glicyna, kwasy organiczne oraz kwasy tłuszczowe. Dodatkowo, zaobserwowano wzmocnienie metabolizmu energetycznego poprzez zwiększenie szlaków metabolicznych związanych z cyklem kwasu cytrynowego oraz wzmocniony wtórny metabolizm przeciwutleniaczy, takich jak metabolizm fenoli [58]. Wyniki tego rodzaju analiz mogą stanowić podstawę do bardziej świadomego i ukierunkowanego rozwoju przemysłu żywnościowego i rolniczego w obliczu narastających zmian klimatycznych [3].

Podsumowanie

Metabolomika, rozwijając się przez ponad dwie dekady, zdobyła coraz większe uznanie i zastosowanie w różnych dziedzinach nauki i przemysłu. Mimo że wiele zastosowań pozostaje w fazie badań podstawowych i nie zostało jeszcze powszechnie wdrożone, metabolomika potwierdza możliwości jej zastosowania, zwłaszcza w badaniach przemysłowych, gdzie idealnie sprawdza się w procesach związanych z oceną jakości, kontrolą jakości oraz optymalizacją procesów. Nowoczesne technologie i odpowiednie oprogramowanie umożliwiają efektywną analizę wielu złożonych próbek, a rozwijające się narzędzia bioinformatyczne ułatwiają analizę danych, co pozwala na uzyskanie wielu cennych informacji z wielowymiarowych danych. W obliczu nadchodzących wyzwań i dynamicznego rozwoju wielu sektorów przemysłu, integracja metabolomiki z innymi technikami omicznymi staje się konieczna i praktyczna w osiągnięciu założonych celów. W obszarach takich jak rozwijanie nowoczesnych leków, poszukiwanie przyjaznych środowisku i wartościowych produktów spożywczych, wykorzystywanie naturalnych substancji w przemyśle farmaceutycznym, specjalistycznym żywieniu czy przemyśle kosmetycznym, a także zrównoważonym rozwoju rolnictwa w obliczu zmian klimatu i zanieczyszczenia środowiska, metabolomika staje się nie tylko praktycznym, opłacalnym narzędziem badawczym, ale również kluczowym elementem postępu i innowacji, z ogromnym potencjałem rozwojowym.

Mgr Patryk KUROPKA w 2023 roku ukończył studia magisterskie na kierunku Chemia i Toksykologia Sądowa na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Pracę licencjacką oraz magisterską realizował w Pracowni Toksykologii Sądowej Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Obecnie jest doktorantem w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Specjalność: Bioanalitika chemiczna, metabolomika, spektrometria mas.