

Zastosowanie analitycznych mikromacierzy białkowych w diagnostyce i terapii raka płuc

STRESZCZENIE

Rak płuc jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów i główną przyczyną zgonów onkologicznych. Analityczne mikromacierze białkowe stanowią obiecujące narzędzie diagnostyczne, szczególnie we wczesnym wykrywaniu choroby. Umożliwiają szybką i czułą analizę wielu biomarkerów, przewyższając tradycyjne metody, oraz pozwalają na różnicowanie typów nowotworu i wspierają medycynę spersonalizowaną. Dodatkową zaletą jest możliwość badania próbek nieinwazyjnych, np. surowicy. Mimo pewnych ograniczeń technologia ta dynamicznie się rozwija. Celem pracy jest przedstawienie sposobu działania, budowy i zastosowań analitycznych mikromacierzy białkowych jako zaawansowanych narzędzi diagnostycznych w biologii molekularnej oraz w badaniach interakcji białkowych. W pracy również zostały omówione korzyści wynikające z zastosowania tej technologii, jej przewagi nad metodami tradycyjnymi, jak i ograniczenia mające wpływ na praktyczne wykorzystanie w diagnostyce i terapii nowotworowej.

NOWOTWÓR PŁUC

Jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie jest rak płuc. Jest on również główną przyczyną zgonów wśród pacjentów onkologicznych. W 2018 roku na świecie odnotowano 1,8 miliona zgonów osób chorujących na raka płuc. Naukowcy szacują, że do roku 2040 liczba zgonów pacjentów z rakiem płuc może wzrosnąć o 67% [1]. Z kolei według najnowszych danych, w roku 2022 odnotowano 2,48 miliona nowych przypadków zachorowań na nowotwór płuc, a liczba zgonów na świecie stale wynosi 1,8 miliona [2].

Wczesne wykrycie raka płuc ma istotne znaczenie ze względu na częste występowanie przerzutów do ośrodkowego układu nerwowego, obserwowanych u 54% pacjentów. Wczesna diagnostyka nowotworu płuc często następuje przypadkowo z powodu wystąpienia niespecyficznych objawów, jak na przykład kaszel, ból w klatce piersiowej i duszności. Standardowe metody diagnostyczne raka płuc obejmują badania obrazowe, takie jak tomografia komputerowa czy radiografia, jednak mogą być niewystarczające do dokładnej analizy zmian nowotworowych [3]. W ostatnich latach nastąpił rozwój diagnostyki molekularnej, która odgrywa coraz większą rolę w dziedzinie nowotworów. Umożliwia ona między innymi wykrywanie specyficznych mutacji i zmian ekspresji biomarkerów nowotworowych [4]. Dlatego prowadzone są poszukiwania nowoczesnych narzędzi diagnostycznych, takich jak analityczne mikromacierze białkowe, w celu wczesnego wykrywania raka płuc.

Uważa się, że głównym czynnikiem ryzyka wystąpienia raka płuc jest palenie tytoniu. Rozwój choroby jest również związany z zanieczyszczeniem powietrza, złą dietą oraz ryzykiem zawodowym, które mogą oddziaływać z paleniem tytoniu i tym samym wpływać na epidemiologię nowotworu płuc. W badaniu przeprowadzonym przez Fan i in. (2023) celem było zrozumienie, w jaki sposób czynniki demograficzne wpływają na wskaźnik umieralności raka płuc [1]. Zostało wykonane badanie GBD (ang. *Global Burden of Disease*) w 2019 roku na poziomie krajowym, regionalnym oraz globalnym. Wyniki badania dowodzą, że do wzrostu liczby zgonów z powodu raka płuc na świecie w latach 1990-2019 miały wpływ wzrost liczby ludności oraz starzenie się populacji. Liczba zgonów na całym świecie wzrosła z 1,07 miliona w 1990 roku do 2,04 miliona w 2019 roku. Dodatkowo wyniki badania wskazują, że na poziomie globalnym, jak i rejonowym w latach 1990-2019 skala wzrostu liczby zgonów raka płuc była wyższa u kobiet niż u mężczyzn na całym świecie. Odnotowano również taki sam wpływ czynników epidemiologicznych i demograficznych u kobiet, jak i u mężczyzn [1].

W 131 krajach zaobserwowano spadek standaryzowanych względem wieku wskaźników śmiertelności z powodu raka płuca, co wskazuje na zmniejszenie

lic. Wiktoria Pławecka ✉

Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, Opole; Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

<https://doi.org/10.18388/ptr62z92>

✉ Autor korespondencyjny:
wiktoria.plawecka@gmail.com

Słowa kluczowe: Analityczne mikromacierze białkowe, rak płuc, biomarkery, diagnostyka nowotworowa, medycyna spersonalizowana

Wykaz skrótów: BRE (ang. *Biomimetic Recognition Elements*) – syntetyczne cząsteczki, których zadaniem jest naśladować naturalnie występujący mechanizm rozpoznawania biologicznego, jak i selektywne wiązanie się z docelowymi cząsteczkami. Stosowane w biosensorach, dzięki wysokiej stabilności oraz odporności na zmieniające się warunki środowiska reakcji, EGFR (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) – białko na powierzchni komórek odpowiadające za regulację przeżycia, wzrostu i podziału komórek nabłonkowych. Należy do receptorów z rodziny tyrozynokinaz, GBD (ang. *Global Burden of Disease*) – badanie mające na celu sprecyzowanie wpływu chorób, czynników ryzyka czy urazów na zdrowie ludności na całym świecie, IP (ang. *Immunoprecipitation*) – metoda selektywnej izolacji białek z lizatów tkankowych lub komórkowych. Metoda wykorzystuje unieruchomione na stałym nośniku (np. cząsteczki magnetyczne) przeciwciała, które po związaniu z docelowym białkiem ulega wytrąceniu (precypitacji), a następnie zostaje oddzielone od pozostałych komponentów próbki, LCNEC (ang. *Large Cell Neuroendocrine Carcinoma*) – rzadki typ nowotworu płuc charakteryzujący się posiadaniem cech SCLC, jak i NSCLC, MIP (ang. *Molecularly Imprinted Polymers*) – syntetyczne polimery, które po przeprowadzeniu procesu polimeryzacji w swojej strukturze zawierają specyficzne miejsca wiązania. Dzięki tym miejscom MIP zdolne są do selektywnego rozpoznawania oraz wiązania z docelowymi cząsteczkami, którym odpowiada konkretne miejsce na syntetycznym polimerze, NSCLC (ang. *Non-Small Cell Lung Cancer*) – najpowszechniejszy nowotwór płuc, który w porównaniu z SCLC cechuje się wolniejszą progresją, SCLC (ang. *Small Cell Lung Cancer*) – złośliwy i szybko proliferujący nowotwór płuc, który charakteryzuje się złym rokowaniem oraz wczesnym rozsiewem, jak i przerzutowaniem.

Podziękowania: Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi Jerzemu Lisowi za opiekę merytoryczną, wsparcie oraz cenne wskazówki. Dziękuję również mojej Rodzinie i Najbliższemu za wsparcie, cierpliwość oraz motywację, które były dla mnie nieocenioną pomocą w trakcie realizacji niniejszej pracy.

ryzika zgonu niezależnie od zmian struktury demograficznej populacji. Największy spadek w liczbie zgonów osób chorujących na nowotwór płuc obserwowano w Wielkiej Brytanii oraz w Szwajcarii [1]. W Azji oraz Europie Wschodniej liczba zgonów z powodu raka płuc nadal wskazuje tendencję wzrostową [2]. Obserwowane różnice regionalne mogą odzwierciedlać zróżnicowane trendy w ekspozycji na dym tytoniowy, a także odmienny poziom wdrożenia programów profilaktyki, diagnostyki i leczenia onkologicznego.

W 2015 roku opublikowana została klasyfikacja raka płuc przez Światową Organizację Zdrowia - WHO (ang. *World Health Organization*), wyróżniająca dwa główne typy: drobnokomórkowy rak płuc, SCLC (ang. *Small Cell Lung Cancer*) i niedrobnokomórkowy rak płuc, NSCLC (ang. *Non-Small Cell Lung Cancer*) [3]. Podział ten opiera się na różnicach histologicznych, obejmujących morfologię komórek nowotworowych, tempo wzrostu oraz odmienny przebieg kliniczny choroby. NSCLC stanowi grupę bardziej heterogenną i obejmuje kilka podtypów histologicznych, podczas gdy SCLC charakteryzuje się bardziej jednolitym obrazem mikroskopowym i znacznie większą agresywnością kliniczną [3].

Rak płuc należy do nowotworów złośliwych o zróżnicowanym pochodzeniu, histologii i tempie progresji zależnie od typu nowotworu. Może on pochodzić z pęcherzyków płucnych, oskrzelików czy gruczołów śluzowych oskrzeli. Najczęściej występującym typem raka płuc jest NSCLC, który odnotowuje się u około 80% przypadków. Jego dominacja może wynikać z dużej różnorodności podtypów oraz cech molekularno-biologicznych nowotworu, np. mutacji receptora naskórkowego czynnika wzrostu, EGFR (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) [3].

W 2021 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) dokonała aktualizacji powyższej klasyfikacji nowotworu płuc. W najnowszej klasyfikacji nowotwory neuroendokrynne zostały wyodrębnione na nowotwory o niskiej złośliwości oraz te o agresywnych postaciach np. SCLC czy rak neuroendokrynnny wielkokomórkowy. W obrębie NSCLC wprowadzono zmiany, w ramach których rak neuroendokrynnny wielkokomórkowy LCNEC (ang. *Large Cell Neuroendocrine*

Carcinoma) uznano za odrębny podtyp. Dodatkowo do systematyki zostały wprowadzone rzadsze nowotwory płuc jak gruczolak oskrzelikowy i guz rzęskowo-śluzowy brodawkowaty. Zostały również doprecyzowane podtypy dotyczące gruczolakoraka płuc według cech molekularnych i ekspresji genów [4].

MIKROMACIERZE BIAŁKOWE

CHARAKTERYSTYKA I KLASYFIKACJA

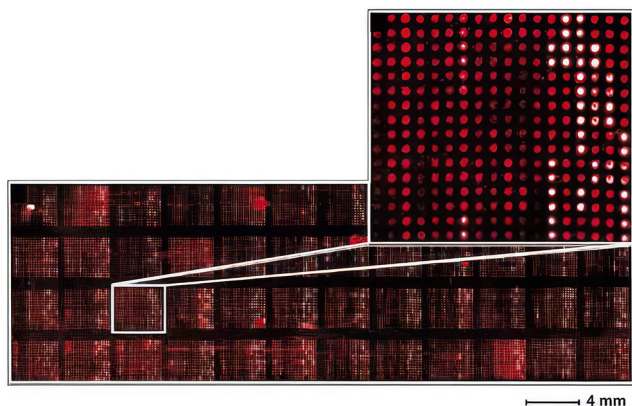
Mikromacierze białkowe stanowią bezpośrednią technikę proteomiczną stosowaną jako wysokoprzepustowe narzędzia w celu jednoczesnej analizy wielu białek. Umożliwiają analizę interakcji białek z innymi cząsteczkami biologicznymi oraz ich aktywności, jak i funkcje [5]. Ze względu na zastosowanie i wytwarzanie mikromacierzy białkowych można podzielić je na trzy grupy: analityczne, funkcjonalne oraz RPPAs (ang. *Reverse-phase protein arrays*) [6].

Analityczne macierze białkowe stosowane są do wykrycia białek bądź ich oznaczenia ilościowego w próbkach. Dzięki temu znalazły zastosowanie jako wychwytyjące mikromacierze w badaniu zmian poziomów ekspresji białek, wykrywaniu biomarkerów nowotworowych, identyfikacji tkanek chorobowych oraz w diagnostyce klinicznej, szczególnie obejmującej choroby nowotworowe. Funkcjonalne macierze białkowe wykorzystywane są w badaniu aktywności biochemicznych i enzymatycznych całych proteomów w celu diagnostyki chorób autoimmunologicznych, czy infekcji. Mogą one badać m.in. interakcje takie jak: białko-białko, białko-lek, białko-lipid czy nawet białko-DNA. Z kolei RPPA znalazło zastosowanie w monitorowaniu sieci sygnalizacyjnych w szlakach wewnątrzkomórkowych, co pozwala na ich wykorzystanie w analizie biomarkerów nowotworowych [6].

BUDOWA MIKROMACIERZY BIAŁKOWYCH

Mikromacierz białkowa jest zminiaturowanym systemem analitycznym składającym się z licznych równoległych stanowisk testowych, dzięki którym możliwe jest jednoczesne wykonanie wielu analiz, przy zastosowaniu minimalnej liczby próbek. Mikromacierz białkowa, zwana również chipem białkowym, zawiera w każdym równoległym stanowisku minimalną ilość białek oczyszczonych o dużej gęstości. Znane są dwa formaty mikromacierzy: dwuwymiarowy i trójwymiarowy. Najczęściej stosowany jest format dwuwymiarowy, w którym miejsca testowe z unieruchomionym białkiem znajdują się na mikroskopijnym szkiełku podstawowym, co pozwala na łatwą detekcję optyczną np. przez fluorescencję. Format trójwymiarowy to tzw. *multiplexed bead-based assays*, który umożliwia bardziej efektywną analizę niewielkiej liczby próbek, dostarczając większą ilość informacji w krótszym czasie [7], [8]. Obraz mikromacierzy białkowej przedstawiony został na rysunku uzupełniającym Ryc. 1.

Zwykle przygotowanie mikromacierzy białkowej opiera się na immobilizacji białka na mikroskopowym szkiełku podstawowym. Powierzchnia z reguły jest płaska i poddana modyfikacji chemicznej poprzez wprowadzenie reaktywnych grup funkcyjnych (m.in. aldehydowych, aminowych i



Rycina 1. Obraz mikromacierzy białkowej przedstawiający immobilizowane sondy na powierzchni nośnika służące do analizy profilu białek. Mikromacierz składa się z 6566 próbek białkowych. Unieruchomione białka fuzyjne z transferazą S-glutatoninową (GST) identyfikowano za pomocą znakowanego przeciwciała anty-GST [5].

epoksydowych), które umożliwiają tworzenie licznych, jak i różnorodnych wiązań z cząsteczkami biologicznymi [9].

Istotnym etapem immobilizacji jest unieruchomienie interesującego nas białka/cząstki wychwytyjącej do odpowiedniej powierzchni. Ma to kluczowe znaczenie w utrzymaniu stabilności unieruchomionych białek/cząstek wychwytyjących i uzyskania najbardziej wiarygodnych wyników. Najczęściej taką powierzchnią jest szkło, plastik, złoto, hydrożele, nitroceluloza [9]. W diagnostyce wykorzystuje się również polimery takie jak PET (ang. *Polyethylene terephthalate*) lub poliwęglan, PC (ang. *Polycarbonate*) [5]. Wybór takiej powierzchni opiera się na szczególnych wymaganiach związanych z niskim tłem (odczyt fluorescencji), niskim niespecyficznym wiązaniem oraz odpowiednią stabilnością i dostępnością sond [9].

Największym wyzwaniem w immobilizacji analitycznych mikromacierzy białkowych jest zapewnienie właściwych cząstek wychwytyjących, które byłyby w stanie wychwycić odpowiedni typ białka nawet przy jego niskim poziomie ekspresji, gdyż w badanej próbce mogą się znajdować setki tysięcy różnych białek o innych stężeniach. Ta trudność odróżnia mikromacierze białkowe od mikromacierzy DNA, w których cały przebieg polega na prostym procesie parowania zasad [8].

Ważnym komponentem analitycznych mikromacierzy białkowych są elementy biorozpoznania, BRE (ang. *Biomimetic Recognition Elements*) odpowiadające między innymi za specyficzne wiązanie analitów, umożliwiając tym samym skuteczne wykrywanie biomarkerów chorobowych. Do najczęściej stosowanych elementów biorozpoznawania należą: przeciwciała, peptydy, aptamery i polimery z nadrukiem molekularnym, MIP (ang. *Molecularly Imprinted Polymers*). Elementy różnią się swoistością, powinowactwem, stabilnością, okresem trwałości oraz kosztem produkcji, co wpływa na ich zastosowanie. Wcześniej BRE izolowano z układów biologicznych np. przeciwciała, natomiast obecnie stosuje się także elementy syntetycznego biorozpoznawania, takich jak polimery z nadrukiem molekularnym [9].

Przeciwciała są istotnymi receptorami układu odpornościowego organizmu, ponieważ biorą udział w rozpoznawaniu i neutralizacji patogenu. W analityce znalazły swoje zastosowanie jako wysoko swoiste i czułe narzędzia do rozpoznawania analitu, np. przy formacie testu kanapkowego. Stosowane są przeciwciała poliklonalne oraz monoklonalne, ale również znana jest nowa technologia przeciwciał rekombinowanych, które są bardziej stabilne. Minusem tych elementów przede wszystkim są wrażliwość na substancje toksyczne, reaktywność krzyżowa oraz wysokie koszty produkcji [9].

Peptydy są krótkimi polimerami aminokwasów zdolnymi do rozpoznawania białek, jonów metali, przeciwciał oraz DNA. Produkcja takich peptydów odbywa się przez syntezę w fazie stałej, a następnie występuje unieruchamianie i znakowanie. Najwięcej stosowane są w momencie połączenia z fluoroforami wrażliwymi na środowisko [9].

Aptamery to sztuczne i zmodyfikowane ligandy kwasów nukleinowych o wysokim powinowactwie do docelowego analitu. Są specyficzne do białek, peptydów, komórek oraz cząsteczek organicznych i nieorganicznych. W przeciwieństwie do przeciwciał nie wymagają uprzedniej aktywacji odpowiedzi immunologicznej, ale tak samo może dojść do wystąpienia reaktywności krzyżowej. Aptamery dodatkowo mogą funkcjonować w środowisku, w którym nie działają przeciwciała, takie jak np. rozpuszczalniki organiczne. Mogą również podlegać modyfikacji potranslacyjnej, dzięki której osiągane są zamierzone efekty, jednakże często może dojść do utrudnienia wiązania aptameru. Najczęściej stosowane są aptamery w testach bezpośrednich, kanapkowych oraz konkurencyjnych [9].

Polimery z nadrukiem molekularnym są specjalnie zaprojektowanymi polimerami, które mają szczególną specyficzność do analitu docelowego. Są bardziej stabilne od naturalnych BRE i zdolne do pracy w ekstremalnych warunkach, takich jak wysoka temperatura, obecność rozpuszczalnika organicznego, zasady lub kwasu. Podstawowym ograniczeniem MIP jest występowanie reaktywności krzyżowej, słaba wydajność w roztworach wodnych oraz wymywanie pozostałości matrycowych. MIP znalazły swoje zastosowanie także w procedurze dostarczania leków, odnajdywania molekuł całych komórek oraz w testach hamowania w momencie wykrywania niskocząsteczkowej toksyny [9].

ZASTOSOWANIE ANALITYCZNYCH MIKROMACIERZY BIAŁKOWYCH

BIOMARKERY

Biomarkery są biologicznymi cząsteczkami wykrywanymi w płynach ustrojowych, we krwi oraz w tkankach. Odgrywają kluczową rolę w diagnostyce, ponieważ umożliwiają identyfikację obecności lub braku choroby. Co więcej, biomarkery stosowane są w celu monitorowania przebiegu choroby oraz w ocenie skuteczności terapii. Można wyróżnić kilka typów biomarkerów, m.in. markery metaboliczne, genetyczne, epigenetyczne, jak i białkowe. W kontekście nowotworu płuc kluczowymi markerami są białka [10]. Związane jest to głównie z ich udziałem w procesach komórkowych. W diagnostyce raka płuc stosuje się wiele biomarkerów białkowych o określonej czułości i swoistości [3]. Odpowiedni biomarker nowotworowy powinien być specyficzny, łatwy do wykrycia oraz obecny we wczesnym stadium choroby nowotworowej [11].

Do głównych biomarkerów raka płuc zalicza się HP (haptoglobina), EGFR (receptor naskórkowego czynnika wzrostu), SAA (amyloid A w surowicy), oraz APOA1 (apolipoproteina A-1). Znane są również markery wskaźnikowe umożliwiające ocenę stadium choroby oraz monitorowanie skuteczności terapii: VIM (vimentina), CALM (calmodulina), czy ANXA (annexina). Niektóre biomarkery nowotworowe występują w niskich stężeniach w surowicy, co utrudnia precyzyjną diagnozę. Dlatego często stosuje się kombinację biomarkerów, co pozwala na dokładniejsze różnicowanie typów nowotworu. Najczęściej wykorzystywaną kombinacją biomarkerów jest połączenie CEACAM oraz CYFRA 21-1 [3]. W Tabeli 1 zestawiono najczęściej wyko-

Tabela 1. Białkowe biomarkery raka płuc [3].

| Typ nowotworu płuc | Reprezentatywne biomarkery białkowe |
|--|--|
| NSCLC, SCLC (niedrobnokomórkowy rak płuc, drobnokomórkowy rak płuc) | AGER, C10orf116, ADD2, PRX, LAMB3, SYNM, SPTA1, ANK1, CAV1, SDPR, IGFBP3, HGF, SAA, HP |
| Gruźlakorak płuc | CALCA, CPS1, CHGB, AGR2, PCSK1, DSG2, CRABP2, CKMT1B, AKR1B10, PCNA |
| Płaskonabłonkowy rak płuc | SERPINB5, PKP1, AKR1C, AKR1C3, S100A2, SFN, MMP14, THBS1, PLAU |

rzystywane biomarkery białkowe stosowane w diagnostyce raka płuc.

Najnowsze badania wskazują na potencjalny nowy biomarker prognostyczny niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC). Badanie zostało opublikowane 1 stycznia 2025 roku przez Zhang i in. (2025). Przeprowadzono analizę cykliny A2 (CCNA2) w celu określenia jej roli w procesie nowotworzenia. Wyniki badania potwierdzają korelację między wzrostem ekspresji biomarkera białkowego a progresją i przerzutowaniem NSCLC. Ponadto wykazano wysoką dokładność diagnostyczną tego biomarkera [12].

WYKRYWANIE BIOMARKERÓW NOWOTWOROWYCH PRZEZ ANALITYCZNE MIKROMACIERZE BIAŁKOWE

Najczęściej wykorzystywanym materiałem biologicznym w diagnostyce raka płuc jest surowica krwi. W surowicy można wykryć charakterystyczne markery nowotworowe [3]. Ponadto w surowicy możliwe jest wykrywanie białek związanych z przerzutowaniem metodą mikromacierzy białkowych [11].

Jedno z najważniejszych zastosowań mikromacierzy przeciwiał jest wykrywanie biomarkerów nowotworowych i mogą być wykorzystywane również do monitorowania progresji choroby. Technika ta umożliwia jednoczesną analizę wielu biomarkerów w próbce, co stanowi istotną przewagę nad wcześniej dominującą spektrometrią mas opartą na mapowaniu białek. Ponadto zastosowanie mikromacierzy przeciwiał pozwala na analizę i porównanie profilu proteomicznego osób zdrowych oraz pacjentów z chorobą nowotworową. W tej technice immobilizowane przeciwiała są najczęściej biotynylowane, natomiast do fluorescencyjnej detekcji i ilościowej oceny poziomu analitu wykorzystywana jest streptawidyna-fikoerytryna. Próbka zawierająca białka będące potencjalnymi biomarkerami nowotworowymi jest inkubowana razem z mikromacierzą. Analizowane białka będące potencjalnymi biomarkerami nowotworowymi są wychwytywane przez immobilizowane przeciwiała dzięki specyficznemu wiązaniu antygen-przeciwiało. W wyniku reakcji generowany jest sygnał fluorescencyjny. Sygnał fluorescencyjny jest następnie odczytywany przez detektor i analizowany przez program bioinformatyczny, umożliwiając porównanie poziomów ekspresji białek pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi na nowotwór [13].

Inną nowoczesną metodą wykrywania biomarkerów nowotworowych jest zastosowanie lektynowej mikromacierzy białkowej. Wykrywa ona nieprawidłowości w resztach cukrowych białek biomarkerów, szczególnie tych stanowiących glikoproteiny. Dzięki temu stosowana jest m.in. w monitorowaniu prawidłowych i nieprawidłowych komórek oraz we wczesnej diagnostyce nowotworowej. W metodzie tej immobilizowane lektyny oddziałują z różnymi cząsteczkami rozpoznającymi, w tym np. znakowane glikoproteiny, biotynylowane glikoproteiny czy znakowana streptawidyna. Na mikromacierz nanoszona jest próbka zawierająca analizowane białka, a następnie inkubowana jest z unieruchomionymi lektyunami. Po związaniu lektyń z biomarkeraми nowotworowymi generowany jest sygnał fluorescencyjny, który odzwierciedla specyfikę oddziaływań oraz wzór glikozylacji. Uzyskany sygnał jest następnie analizowany przez dedykowany program bioinformatyczny [13].

Wcześniej szeroko stosowaną metodą analizy profilu proteomicznego była spektrometria masowa. Pozwala ona na mapowanie, analizę i identyfikację białek w próbkach biologicznych. Dostarcza informacji o różnicach profili białkowych między komórkami prawidłowymi, a komórkami nowotworowymi. Dzięki zastosowaniu tej metody Kang i wsp. odkryli główny biomarker nowotworu płuc, jakim jest haptoglobina (HP) [3]. Dodatkowo, spektrometria mas umożliwiła różnicowanie profili białkowych pomiędzy różnymi typami raka płuc [3]. Wraz z rozwojem technologii mikromacierze stały się nowoczesną alternatywą dla spektrometrii masowej i testów immunoenzymatycznych (np. ELISA, Western blot). W przeciwieństwie do mikromacierzy białkowych testy immunoenzymatyczne umożliwiają analizę jedynie pojedynczych analitów. Ponadto analiza z wykorzystaniem mikromacierzy trwa krócej niż 24 godziny od przygotowania próbki do analizy danych [14]. Przeprowadzono badanie w celu dokładnego porównania metody spektrometrii mas oraz mikromacierzy białkowych. Naukowcy odkryli, że te metody mogą wzajemnie się uzupełniać. Zastosowanie mikromacierzy białkowych w połączeniu ze spektrometrią masową w przyszłości może zwiększyć skuteczność i dokładność analizy białek, szczególnie w wykrywaniu biomarkerów nowotworowych. Jest to kluczowe dla wczesnej diagnostyki nowotworowej [13].

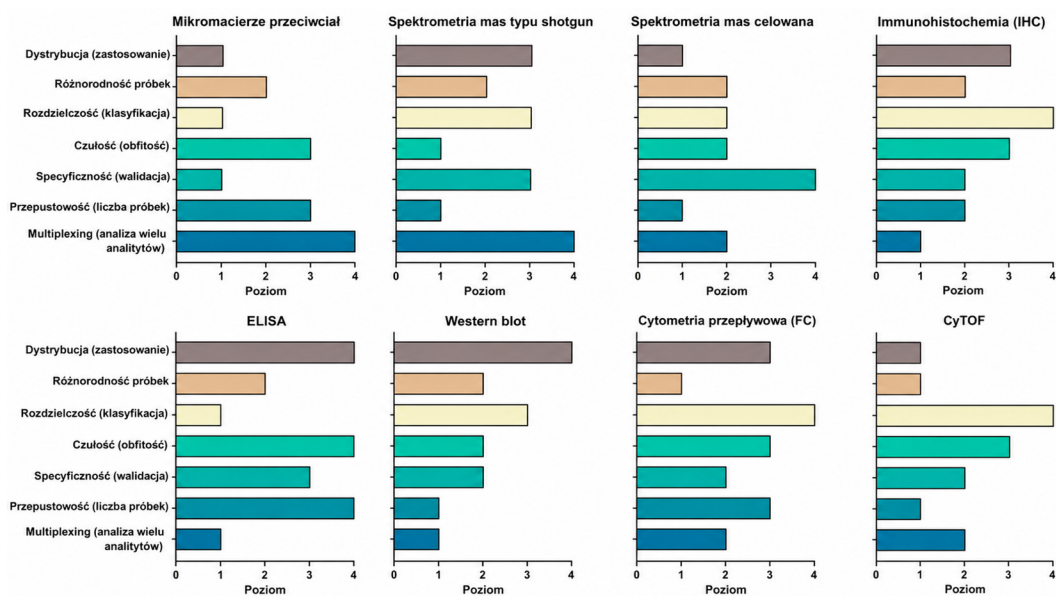
Na Rycinie 2 porównano różne metody wykrywania białek/biomarkerów biorąc pod uwagę: multipleksowanie, przepustowość, swoistość, czułość, rozdzielczość, różnorodność próbek oraz zakres zastosowań. Najwyższa możliwa ocena dla każdego parametru wynosiła cztery. Analiza porównawcza wskazuje, że mikromacierze białkowe w tym mikromacierze przeciwiał wyróżniają się szczególnie wysoką przepustowością oraz możliwością jednoczesnej analizy wielu biomarkerów. W porównaniu z metodami takimi jak ELISA czy Western blot pozwalają one na bardziej kompleksową analizę próbek, natomiast w zestawieniu ze spektrometrią masową oferują większy potencjał do wysokoprzepustowych badań przesiewowych. Przedstawione porównanie podkreśla zalety mikromacierzy białkowych w zastosowaniach związanych z identyfikacją biomarkerów nowotworowych [14].

PROFILOWANIE
BIAŁKOWE Z
WYKORZYSTANIEM
ANALITYCZNYCH
MIKROMACIERZY
BIAŁKOWYCH

Surowica stanowi powszechnie wykorzystywany materiał biologiczny w badaniach biomarkerów nowotworowych ze względu na niską inwazyjność pobrania oraz możliwość zastosowania w badaniach przesiewowych. Jej wykorzystanie eliminuje konieczność pobierania materiału biopsyjnego [15]. Z tego względu surowica znajduje coraz szersze zastosowanie w wykrywaniu specyficznych biomarkerów nowotworowych. Jedną z metod profilowania surowicy jest bezpośrednie wykorzystanie mikromacierzy przeciwciał do identyfikacji biomarkerów. Analiza auto-przeciwciał obecnych w surowicy z wykorzystaniem mikromacierzy białkowych może być przydatna w diagnostyce raka płuc. Taką metodę zastosowali Gao i wsp. używając mikromacierzy białkowej z 84 przeciwciałami przy badaniu surowicy pacjentów chorych na raka płuc [11].

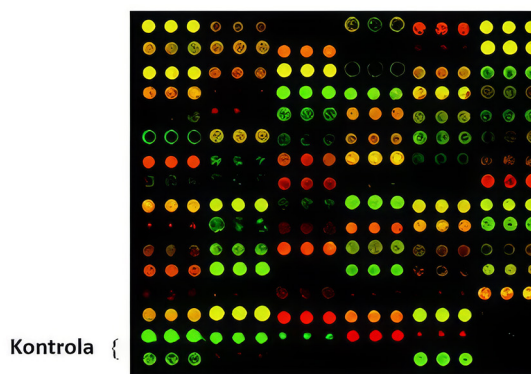
Gao i in. (2005) w swoim badaniu wykorzystali mikromacierz pokrytą nitrocelulozą do zbadania próbek surowicy 24 zdrowych osób, 24 pacjentów chorych na raka płuc oraz 32 pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc, COPD (ang. *Chronic obstructive pulmonary disease*). Wykorzystali 2-kolorową amplifikację toczącego się koła (RCA) w celu oznaczenia ilościowego białek (Ryc. 3). Odkryli, że siedem białek wykazało różnice w ekspresji między pacjentami z nowotworem, a pacjentami z COPD. Do tych białek należy m.in. białko C-reaktywne, CRP (ang. *Creactive protein*) oraz amyloid A w surowicy, SAA (ang. *Serum Amyloid A*) potwierdzone techniką Western blot. U pacjentów chorujących na nowotwór płuc odnotowano również obniżenie poziomu transferyny i gelsoliny. Wyniki badania sugerują, że dziedziną profilowania białek przy użyciu mikromacierzy przeciwciał jest skutecznym narzędziem w diagnostyce nowotworowej płuc. Co więcej, metoda ta umożliwia identyfikację białek pozwalających na różnicowanie osób zdrowych i chorych na raka płuc. Według autorów badania analiza charakterystycznych profili białkowych może również informować o odpowiedzi organizmu na nowotwór [16].

Podobne wnioski uzyskali Brezina i in. (2015), którzy przeprowadzili badanie mające na celu identyfikację sygnatur immunologicznych specyficznych dla raka płuc przez analizę auto-przeciwciał w surowicy [17]. W badaniu zostały użyte analityczne mikromacierze białkowe pokryte unieruchomionymi antygenami nowotworowymi TAA (ang. *Tumor Associates Antigens*). Próbkę surowicy pobrano od pacjentów chorych na nowotwór płuc oraz zdrowych osób

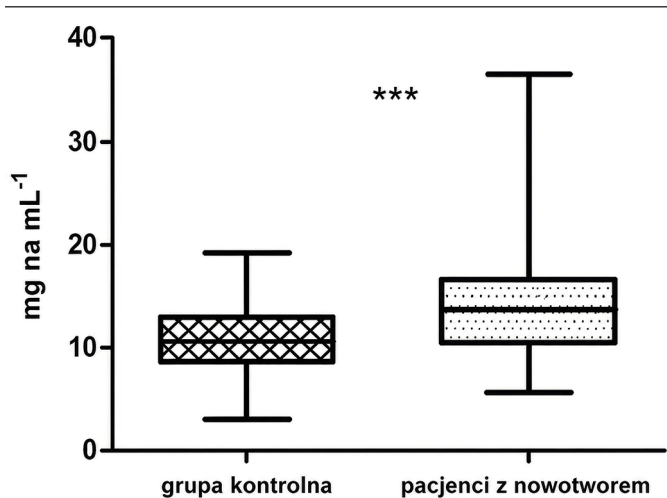


Rycina 2. Porównanie różnych metod wykrywania białek/biomarkerów [14].

stanowiących próbę kontrolną. Autorzy postawili hipotezę, że specyficzne wzory wychwyconych auto-przeciwciał IgG z próbek surowicy przez antygeny TAA mogą wspomagać wczesną diagnostykę raka płuc. Wyniki potwierdziły postawioną hipotezę. Co więcej, autorzy badania dostrzegli różnice między poziomem auto-przeciwciał IgG w próbkach, co mogło korelować z progresją nowotworu. Przykładowo, stężenie IgG w osoczu było znacząco wyższe u pacjentów chorujących na nowotwór płuc w porównaniu z grupą kontrolną (test t, $p < 0,0001$), co przedstawiono na Ryc. 4. Odnotowano również różnice w profilu auto-przeciwciał, które mogą być pomocne w różnicowaniu typów raka płuc. Badanie potwierdziło skuteczność stosowania analitycznych mikromacierzy białkowych w profilowaniu auto-przeciwciał jako narzędzie wykorzystywane we wczesnej diagnostyce raka płuc ze względu na wysoką czulość i swoistość. Wyniki sugerują, że charakterystyczne wzory auto-przeciwciał



Rycina 3. Obraz mikromacierzy przeciwciał uzyskany przez 2-kolorową detekcję RCA w badaniu surowicy pacjentów z rakiem płuca i grupy kontrolnej [16]. Strategia polega na znakowaniu próbek biotyną lub digoksygeniną i hybrydyzacji z układem przeciwciał. RCA wzmacnia sygnał fluorescencyjny pochodzący od znakowanych białek biotyną (Cy3) lub digoksygeniną (Cy5). Intensywność sygnału odczytywana jest przez skaner umożliwiający wykrywanie biomarkerów białkowych z wysoką czulością.



Rycina 4. Porównanie stężenia IgG w osoczu grupy kontrolnej (10,9 mg/ml \pm 0,33) i pacjentów z rakiem płuca (14,1 mg/ml \pm 0,47) w badaniu proteomicznym [17].

mogą posłużyć jako wskaźniki do monitorowania odpowiedzi organizmu na leczenie [17]. Na Ryc. 5 przedstawiono schemat badania.

Kolejne badanie zostało przeprowadzone w 2021 roku przez Liu i in. (2021), którzy wykorzystali mikromacierz lektynową w celu analizy zmian glikozylacji białek w pobranych płynach z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, BAL (ang. *Bronchoalveolar lavage*) [15]. Autorzy badania chcieli określić, czy określone wzorce glikozylacji mogą pełnić funkcję biomarkerów nowotworowych we wczesnej diagnostyce raka płuca. Próbkę BALF pobrano od pacjentów z gruczolakorakiem, ADC (ang. *Adenocarcinoma*), rakiem płaskonabłonkowym, SCC (ang. *Squamous Cell Carcinoma*), drobnokomórkowym rakiem płuca (SCLC) oraz pacjentów z łagodnymi chorobami płuca, BPD (ang. *Bronchopulmonary Dysplasia*) w celu porównania różnic w ekspresji glikoprotein. Badanie obejmowało około 401 próbek podzielonych na kohortę treningową, walidacyjną i podwójną ślepą kohortę. Wykorzystano mikromacierz lektynową, w której 15 (PHA-E, BPL, EEL) i 14 (LCA, SJA, PTL-II) lektyn wykazały istotne różnice w ekspresjach między poszczególnymi typami raka a grupą pacjentów z BPD. Czułość diagnostyczna modeli wynosiła 91,7%, a dokładność różnicowania pacjentów z rakiem płuca od osób zdrowych do 86,4%. Najniższą skuteczność odnotowano przy drobnokomórkowym raku płuca (71,2%) oraz płaskonabłonkowym raku płuca (67,1%). Wyniki badania wskazują, że wykryte wzorce glikozylacji białek w BALF mogą służyć jako nowe biomarkery w diagnostyce raka płuca również we wczesnych stadiach raka płuca. Dodatkowo przeprowadzono analizę blottingu lektynowego, aby potwierdzić różnice w glikozylacji między badanymi grupami pacjentów uzyskanych z analizy mikromacierzy. Przeprowadzone badanie potwierdza efektywność stosowania mikromacierzy lektynowej jako narzędzia diagnostycznego w różnicowaniu typów nowotworu płuca, mimo różnic w skuteczności zależnych od podtypu nowotworu [15].

Mikromacierz lektynowa została również zastosowana przez Ma i in. (2019) u pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem płuca, LUSC (ang. *Lung Squamous Cell Carcinoma*) [18].

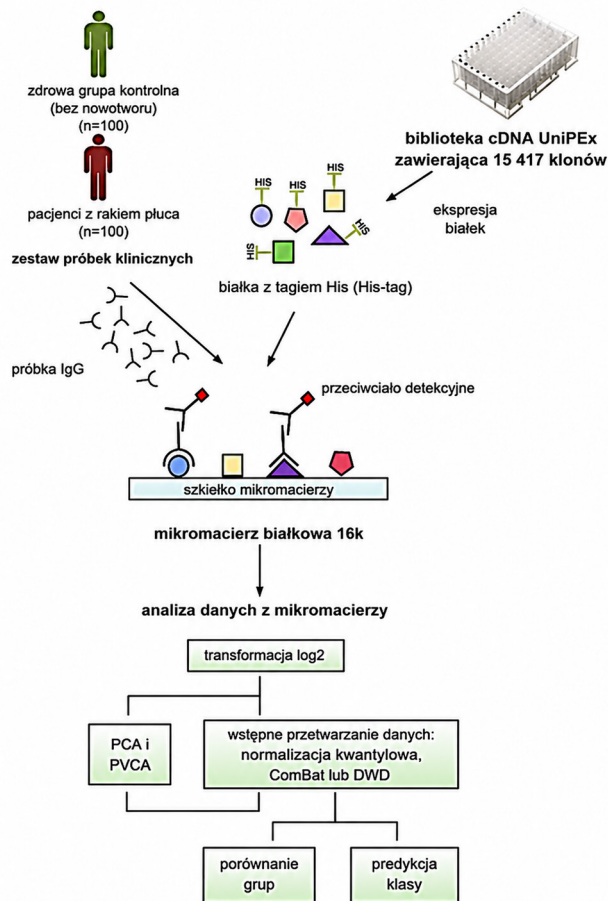
Jednak materiałami do badania były tkanki płucne pobrane w trakcie resekcji chirurgicznej od pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem płuca oraz osób zdrowych. Zastosowana mikromacierz składała się z 37 unieruchomionych lektyn, które charakteryzowały się różnym powinowactwem wiązania. Próbkę inkubowano z białkami znakowanymi fluorescencyjnie Cy3. Dzięki użyciu w badaniu mikromacierzy wykryto wzorce glikozylacji w pobranych tkankach. Dodatkowo w celu zweryfikowania wyników i znormalizowania różnic między próbkami zdrowych i chorych pacjentów zastosowano blotting lektynowy, ilościowy PCR w czasie rzeczywistych oraz histochemię lektynową opartą na fluorescencji. Glikozylacja bierze udział w istotnych procesach, takich jak komunikacja międzykomórkowa, interakcje białko-białko, czy przerzutowaniu nowotworów. Stąd nieprawidłowa glikozylacja może być skutecznym wskaźnikiem nowotworzenia, a analiza nieprawidłowych wzorców w pobranych tkankach może także posłużyć w zrozumieniu mechanizmów rokowania. Wyniki uzyskane w badaniu przy użyciu mikromacierzy lektynowej wskazują istotne zmiany w ekspresji wzorców glikozylacji tkanek nowotworowych i próbek kontrolnych ($p < 0,05$). Przeprowadzone badanie potwierdza skuteczność mikromacierzy lektynowych jako narzędzia diagnostycznego umożliwiającego różnicowanie tkanek nowotworowych i zdrowych [18].

WYKORZYSTANIE ANALITYCZNYCH MIKROMACIERZY BIAŁKOWYCH W TERAPII NOWOTWOROWEJ

Nowotwory, w tym rak płuca, mają niejednorodny charakter, dlatego zastosowane leki często mogą prowadzić do odmiennych efektów terapeutycznych. W konsekwencji dla niektórych pacjentów chorujących na nowotwór standardowe leczenie może być nieskuteczne. Specyficzne biomarkery nowotworowe odgrywają kluczową rolę w diagnostyce w określeniu stopnia złośliwości nowotworu oraz w prognozowaniu przebiegu choroby. W terapii kluczowe jest poszukiwanie biomarkerów, które pozwoliłyby na ocenę skuteczności leczenia farmakologicznego, ale również do monitorowania odpowiedzi organizmu na terapię [13].

W opracowywaniu leków i skutecznych terapii raka płuca kluczowy jest receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Stał się istotnym celem w poszukiwaniu aktywnych klinicznie inhibitorów, które celują w EGFR oraz blokują szlak sygnałowy [19]. Analityczne mikromacierze białkowe umożliwiają wykrywanie prognostycznych biomarkerów nowotworowych, umożliwiających monitorowanie odpowiedzi pacjenta na zastosowaną terapię np. inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR [20].

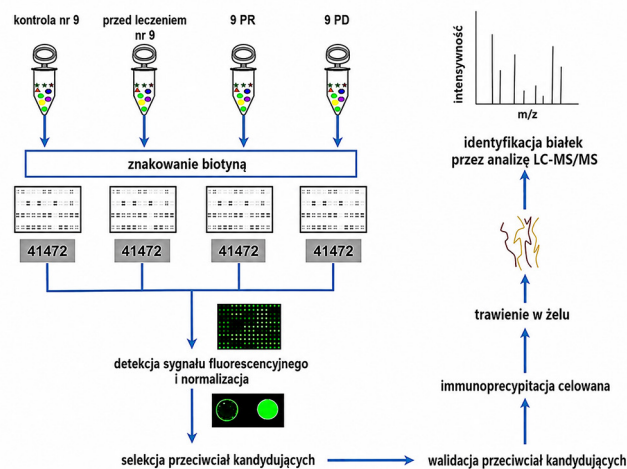
Shang i in. (2019) zastosowali mikromacierz przeciwciał składającą się z 41472 unieruchomionych przeciwciał (Ryc. 6). Celem badania była identyfikacja biomarkerów do oceny skuteczności terapii celowanej w gruczolakoraku płuca z mutacją EGFR. Przeciwciała umożliwiały ilościowe profilowanie białek w surowicach pobranych od pacjentów poddanych terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR (EGFR-TKI). Surowice zostały pobrane przed i w trakcie terapii oraz w momencie nabycia oporności na terapię przez organizm. Wyniki uzyskane w badaniu potwierdziły korelację między zmianami stężenia izoformy drugiego łańcucha



Rycina 5. Schemat przebiegu badania opartego na mikromacierzach białkowych oraz metodach normalizacji danych w diagnostyce raka płuca [17].

cha alfa fibrynowego (FGA2), a reakcją na EGFR-TKI ($p < 0,05$). Przed terapią FGA2 utrzymywał się na określonym poziomie, ale w momencie wprowadzenia terapii EGFR-TKI poziom FGA2 znacząco spadał. Po nabyciu oporności na terapię poziom FGA2 ponownie wzrastał. Przeprowadzono analizę danych z mikromacierzy przeciwciał. Następnie zweryfikowane przeciwciała wykorzystano do identyfikacji białka przez immunoprecypitację, IP (ang. *Immunoprecipitation*) i spektrometrię mas. Wyniki badania wykazały, że FGA2 może być potencjalnym biomarkerem do monitorowania skuteczności terapii EGFR-TKI u pacjentów z nowotworem płuca. Badanie potwierdziło również skuteczność zastosowania mikromacierzy przeciwciał w celu profilowania białek i identyfikacji biomarkerów. Co więcej, badanie podkreśla potencjalne zastosowanie mikromacierzy przeciwciał w badaniach klinicznych, umożliwiając skuteczniejsze leczenie spersonalizowane oraz monitorowanie odpowiedzi pacjenta [21].

Zastosowanie mikromacierzy białkowych w terapii wynika z ich zdolności do wykrywania różnic na poziomie komórkowym, modyfikacji potranslacyjnych, zmian ekspresji białek, nowotworzenia oraz przerzutowania. Dzięki temu mikromacierze białkowe mogą znaleźć zastosowanie także w medycynie spersonalizowanej, jak również w rokowaniu. We współczesnej onkologii coraz częściej lekarze skupiają się na terapii spersonalizowanej, która opiera się na analizie specyficznych biomarkerów w celu doboru odpowied-



Rycina 6. Schemat przebiegu badania, którego celem było wykrycie biomarkera terapeutycznego terapii celowanej gruczolakoraka płuca z mutacją EGFR [12]. PR - odpowiedź częściowa, PD - progresja nowotworu.

niej strategii leczenia. W terapii analityczne mikromacierze białkowe umożliwiają porównanie profili białkowych, co pozwala na dostosowanie leczenia pod konkretne cechy biologiczne guza [20].

W Stanach Zjednoczonych rak płuca jest jedną z głównych przyczyn zgonów nowotworowych. Tym samym ze względu na niski wskaźnik przeżywalności poszukiwane są nowatorskie środki, które pozwolą na efektywną terapię celowaną oraz medycynę spersonalizowaną. W artykule autorstwa Cohen i in. (2017) zostały przedstawione markery komórek nowotworowych płuca, które charakteryzowały się wysoką ekspresją mRNA mierzoną przy użyciu mikromacierzy białkowych (Tab. 2) [22]. Wyniki badania wskazują, że wspomniane biomarkery nowotworowe związane są ze złym rokowaniem u pacjentów chorujących na nowotwór płuca. Wykorzystanie mikromacierzy białkowych do walidacji prognostycznych biomarkerów nowotworowych pozwala na wdrożenie spersonalizowanej terapii. Co więcej, przed rozpoczęciem terapii przeanalizowano punkty kontrolne układu odpornościowego przy użyciu mikromacierzy tkanekowych i immunofluorescencji multipleksowej. Połączenie analizy ekspresji biomarkerów z badaniem odpowiedzi immunologicznej organizmu pacjenta może przyczynić się do lepszego dostosowania terapii oraz zwiększenia skuteczności leczenia nowotworu płuca [22].

Tabela 2. Biomarkery komórek nowotworowych raka płuca, u których zanotowano wysoką ekspresję mRNA w badaniu markerów powierzchniowych komórek nowotworowych. Źródło: opracowanie własne na podstawie [22].

| Skrót biomarkera | Pełna nazwa biomarkera |
|------------------|---------------------------------------|
| CA9 | Anhydraza węglanowa 9 |
| CA12 | Anhydraza węglanowa 12 |
| CT83 (Cxorf61) | Antygen raka/jądra 83 |
| GPR87 | Receptor sprzężony z białkiem G |
| LYPD3 | Białko zawierające domenę LY6/PLAUR |
| SLC7A11 | Transporter substancji rozpuszczonych |

W 2020 roku został opublikowany artykuł, który przedstawia badanie związane z terapią raka płuc. Tan i in. (2020) badali profil autoprzeciwciał (AAb) z próbek osocza pacjentów otrzymujących terapię opartą na inhibitorach białka programowalnej śmierci komórki 1 - PD1 [23]. Pacjentów podzielono na cztery kohorty: dwie odkrywczycze, weryfikacyjną i walidacyjną. Osoby biorące udział w badaniu chorowały między innymi na niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC), chłoniaka oraz mięsaka pęcherzyków płucnych. W badaniu zastosowano programowalną mikromacierz białkową otrzymaną metodą NAPPA (ang. *Nucleic Acid Programmable Protein Array*). Użycie mikromacierzy białkowej pozwoliło na wysokoprzepustową analizę badanych autoprzeciwciał związanych z terapią anty-PD1. W momencie przeprowadzenia analizy wyników otrzymanych z mikromacierzy białkowej wykryto 23 autoprzeciwciała, które potencjalnie mogłyby pełnić rolę biomarkerów przewidujących odpowiedź na terapię. Dodatkowo został przeprowadzony test immunoenzymatyczny ELISA, aby zweryfikować skuteczność wykrytych biomarkerów. Spośród analizowanych biomarkerów zwrócono uwagę na pięć kluczowych autoprzeciwciał przedstawionych w Tabeli 3. Skuteczność predykcyjną dla pacjentów z NSCLC wykazał biomarker SIX2 AAb (wartość AUC 0,85-0,90), a biomarker EIF4E2 AAb był silnie związany z odpowiedzią pacjentów z chłoniakiem. Wyniki badania wskazują, że wykorzystanie mikromacierzy białkowej otrzymanej metodą NAPPA może dostarczyć informacji o nowych predykcyjnych biomarkerach w odpowiedzi na terapię anty-PD1. Metoda ta stanowi cenne narzędzie identyfikacyjne, które może zastąpić inwazyjną biopsję tkankową w ocenie skuteczności terapii. Uzyskane wyniki potwierdzają efektywność stosowania mikromacierzy białkowych w terapii raka płuc oraz monitorowaniu odpowiedzi organizmu na leczenie [23].

OGRANICZENIA ZASTOSOWANIA ANALITYCZNYCH MIKROMACIERZY BIAŁKOWYCH

Na przestrzeni lat w wielu pracach naukowych zostały przedstawione ograniczenia dotyczące technologii mikromacierzy białkowych. Początkowo największym wyzwaniem było opracowanie odpowiednich cząsteczek wychytujących, które byłyby zdolne do wiązania określonego typu białka, nawet w niskim stężeniu. Dodatkowo, ze względu na złożoność białek powinowactwo tych cząsteczek jest trudniejsze do przewidzenia niż w przypadku parowania zasad DNA. Kolejnymi utrudnieniami był brak metod amplifikacji sygnału oraz trudności z automatyzacją związane z obniżoną czułością i stabilnością białek [8]. Ograniczenia związane ze stabilnością białek wynikają z wpływu niekorzystnych warunków środowiskowych na utratę ich aktywności biologicznej białek oraz ich podatności na proces denaturacji. Ma to znaczenie głównie przy doborze odpowiednich technik immobilizacji cząsteczek i przechowywania. Niższa czułość detekcji mikromacierzy białkowych była również związana z powolnym procesem dyfuzji białek w kierunku powierzchni mikromacierzy. Istotnym ograniczeniem w technologii mikromacierzy białkowych jest występowanie reaktywności krzyżowej przeciwciał. Niektóre przeciwciała wykazują powinowactwo do kilku różnych białek, co wiąże się z powstawaniem fałszywie dodatnich wyników

[24]. Wystąpienie reaktywności krzyżowej jest trudnością szczególnie dla mikromacierzy przeciwciał o wysokiej gęstości, gdyż wraz z większą liczbą przeciwciał zjawisko to jest trudniejsze do kontrolowania. Kolejnym ograniczeniem analitycznych mikromacierzy białkowych opartych na przeciwciałach jest trudność w uzyskaniu trwałych i wysokiej jakości sond [11]. Kolejnymi barierami dla mikromacierzy białkowych są wysokie koszty produkcji, wynikające z konieczności stosowania zaawansowanych technik immobilizacji oraz specjalistycznego sprzętu [25].

Obecnie ograniczenia takie jak dostępność odpowiednich bioreagentów, reaktywność krzyżowa przeciwciał, stabilność białek, transport masy cząsteczek, zakresy detekcji i czułości oraz wysokie koszty nadal stanowią istotne ograniczenia w technologii mikromacierzy białkowych [13, 20]. Do głównych problemów należy również brak standaryzacji oraz trudności związane z kontrolą jakości. W związku z różnicami w protokołach eksperymentalnych dotyczących odczynników czy zastosowanego sprzętu utrudnione jest porównywanie wyników między laboratoriami [20]. Co więcej, uzyskane wyniki z mikromacierzy białkowych są skomplikowane i obszerne, stąd konieczność zastosowania zaawansowanych metod analitycznych, takich jak analiza bioinformatyczna. Dodatkowo wyniki muszą być poddane weryfikacji przy użyciu testów ELISA czy Western blottingu. Kolejne przeszkody dotyczą zastosowania mikromacierzy białkowych w badaniach klinicznych i wykrywaniu biomarkerów. Mimo znanych biomarkerów nowotworowych ich skuteczność kliniczna jest ograniczona w związku z heterogenicznością nowotworów i ograniczoną liczbą analizowanych próbek. Dodatkowo przeszkodę stanowi brak odpowiednich systemów detekcji w przypadku metod, które są oparte na teście ELISA. Ponadto pojawiają się trudności z ilościową analizą danych wynikające z utrudnionej precyzyjnej kwantyfikacji wyników uzyskanych z mikromacierzy białkowych [13].

PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA ANALITYCZNYCH MIKROMACIERZY BIAŁKOWYCH

Proteomika jest dziedziną, która dynamicznie rozwija się w diagnostyce i terapii nowotworowej. Jednak, aby technologia mikromacierzy białkowych mogła być szerzej stosowana w badaniach, powinna być udoskonalana, zwłaszcza pod kątem jej ograniczeń [11]. Należy skoncentrować się na najistotniejszych aspektach, takich jak ujednoczenie

Tabela 3. Kluczowe biomarkery odpowiedzi na terapię anty-PD1 w badaniu profilowania autoprzeciwciał. Źródło: opracowanie własne na podstawie [23].

| Skrót biomarkera | Pełna nazwa biomarkera |
|------------------|---|
| PD1 AAb | Autoprzeciwciała przeciwko receptorowi PD1 |
| PD-L1 AAb | Autoprzeciwciała przeciwko ligandowi PD-L1 |
| P53 AAb | Autoprzeciwciała przeciwko białku P53 |
| SIX2 AAb | Autoprzeciwciała przeciwko czynnikowi transkrypcyjnemu SIX2 |
| EIF4E2 AAb | Autoprzeciwciała przeciwko białku związanym z translacją EIF4E2 |

standardów, obniżenie kosztów badań, walidacja wyników oraz opracowanie trwałych sond. Obniżenie kosztów komercyjnych mikromacierzy białkowych poprzez opracowanie tańszych metod wytwarzania oraz ujednoczenie standardów badań z ich wykorzystaniem mogłoby zwiększyć dostępność i funkcjonalność tych narzędzi. [13].

Mimo szerokiego zastosowania mikromacierzy białkowych nie są one jedynym narzędziem stosowanym w diagnostyce i terapii nowotworowej. Dostępne są inne narzędzia eksperymentalne, które po połączeniu z technologią mikromacierzy białkowych pozwalają uzyskać bardziej efektywne wyniki badań. W 2017 roku opublikowano pracę, w której badacze zauważyli, że mikromacierze białkowe mogą być skutecznie łączone ze spektrometrią masową. To odkrycie może przyczynić się do rozwoju tej technologii i zastosowania jej w terapii nowotworowej między innymi poprzez monitorowanie odpowiedzi pacjentów na leczenie [26].

Głównym celem naukowców jest także opracowanie odzwierciedlających i wysoce czułych mikromacierzy białkowych. W tak opracowanych narzędziach poprawiłaby się powtarzalność wyników. Proponowanych jest wiele rozwiązań, takich jak zaproponowane przez Brittain i in. (2019) sieci hydrożelowe przyłączone do powierzchni mikromacierzy [27]. Autorzy wskazują, że brak odpowiednich materiałów chemicznych do osadzania mikromacierzy hamuje postęp tych narzędzi [27].

Często wyniki uzyskane z mikromacierzy białkowych są trudne do ilościowej analizy, zwłaszcza w przypadku biomarkerów białkowych np. w diagnostyce nowotworowej. Przełomowym rozwiązaniem tego ograniczenia była strategia liczenia kanapek wspomagana sondą nanocząsteczek złota, GNPs (ang. *Gold nanoparticles*). Zastosowanie tej koncepcji wykazało wysoką korelację sondy GNP z testem ELISA. Wyniki wskazują również na duży potencjał opracowanej strategii w analizie ilościowej biomarkerów białkowych i wykrywaniu białek docelowych w ultraniskich stężeniach próbek. Sonda GNP według autorów może znaleźć również zastosowanie w analizie próbek wczesnych stadiów nowotworu [28].

Dziś mikromacierze białkowe są coraz szerzej wykorzystywane w onkologii. Szczególnie znalazły zastosowanie w identyfikacji nowych biomarkerów czy identyfikacji cząsteczek związanych z wczesnym wykrywaniem nowotworów. Co więcej, połączenie technologii mikromacierzy białkowych z bioinformatyką daje nowe możliwości dla rozwoju diagnostyki i terapii nowotworowej. Możliwe jest zarówno monitorowanie przebiegu choroby, jak i dobór odpowiedniego leczenia. Dodatkowo wzrasta znaczenie i zastosowanie mikromacierzy białkowych w medycynie spersonalizowanej. Dzięki tym postępom uzyskiwane są dokładniejsze wyniki diagnostyczne oraz możliwe jest precyzyjne dopasowanie terapii do indywidualnych potrzeb pacjenta [20].

PODSUMOWANIE

Rak płuc pozostaje jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie oraz główną przyczyną zgonów

związanych z chorobami nowotworowymi. Przedstawione w pracy badania wskazują, że analityczne mikromacierze białkowe mają duży potencjał jako narzędzie diagnostyczne, szczególnie w wykrywaniu wczesnych stadiów choroby. Technologia ta umożliwia jednoczesną identyfikację wielu biomarkerów przy wysokiej wydajności i w krótszym czasie, co ma istotne znaczenie dla postawienia precyzyjnej diagnozy.

W porównaniu z tradycyjnymi metodami analizy, takimi jak spektrometria masowa czy testy immunoenzymatyczne, mikromacierze białkowe charakteryzują się wysoką czułością, swoistością oraz możliwością prowadzenia badań przesiewowych na większą skalę. Badania dowodzą również, że technologia ta pozwala na skuteczne różnicowanie typów raka płuc oraz analizę autoprzeciwciał i profili białkowych, które mogą mieć znaczenie w doborze terapii dostosowanej do indywidualnych cech pacjenta. Wskazuje to na rosnącą rolę mikromacierzy białkowych w rozwoju medycyny spersonalizowanej w onkologii.

Dodatkową zaletą mikromacierzy białkowych jest możliwość analizy materiałów biologicznych pobieranych w sposób mało inwazyjny, takich jak surowica krwi, co może ograniczyć konieczność wykonywania biopsji. Pomimo obiecujących wyników technologia ta nadal posiada pewne ograniczenia związane między innymi z kosztami badań, standaryzacją metod oraz analizą i interpretacją danych. Jednak dynamiczny rozwój proteomiki oraz postęp technologiczny wskazują, że mikromacierze białkowe mogą w przyszłości odegrać istotną rolę w diagnostyce molekularnej, monitorowaniu terapii oraz rozwoju nowych strategii leczenia raka płuc.

W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę analitycznych mikromacierzy białkowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich budowy, mechanizmu działania oraz zastosowania w diagnostyce molekularnej i terapii nowotworów płuc. Omówiono również potencjał tej technologii jako nowoczesnego narzędzia badawczego oraz najważniejsze ograniczenia utrudniające jej szersze wykorzystanie w praktyce klinicznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Fan Y, Jiang Y, Gong L, Wang Y, Su Z, Li X, Wu H, Pan H, Wang J, Meng Z, Zhou Q, Qiao Y (2023) Epidemiological and demographic drivers of lung cancer mortality from 1990 to 2019: results from the global burden of disease study 2019. *Front Public Health* 11: 1054200
2. World Cancer Research Fund (2024) Lung cancer statistics. Dostęp: 07.03.2025. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/lung-cancer-statistics/>
3. Zamay TN, Zamay GS, Kolovskaya OS, Zukov RA, Petrova MM, Gargaun A, Berezovski MV, Kichkailo AS (2017) Current and prospective protein biomarkers of lung cancer. *Cancers* 9: 155
4. Sasaki T, Kuno H, Hiyama T, Oda S, Masuoka S, Miyasaka Y, Taki T, Nagasaki Y, Ohtani-Kim SJY, Ishii G, Kaku S, Shroff GS, Kobayashi T (2024) 2021 WHO Classification of Lung Cancer: Molecular Biology Research and Radiologic-Pathologic Correlation. *Radiographics* 44: e230136
5. Spisák S, Guttman A (2009) Biomedical Applications of Protein Microarrays. *Curr Med Chem* 16: 2806-2815
6. Huang Y, Zhu H (2017) Protein Array-based Approaches for Biomarker Discovery in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 15: 73-81

7. Chen CS, Zhu H (2006) Protein microarrays. *Biotechniques* 40: 423-429
8. Joos T, Bachmann J (2009) Protein microarrays: potentials and limitations. *Front Biosci* 14: 4376-4385
9. Sauer U (2017) Analytical protein microarrays: Advancements towards clinical applications. *Sensors* 17: 256
10. Das S, Dey MK, Devireddy R, Gartia MR (2023) Biomarkers in Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis. *Sensors* 24: 37
11. Hu B, Niu X, Cheng L, Yang LN, Li Q, Wang Y, Tao SC, Zhou SM (2015) Discovering cancer biomarkers from clinical samples by protein microarrays. *Proteomics Clin Appl* 9: 98-110
12. Zhang L, Wang S, Wang L (2025) Comprehensive analysis pinpoints CCNA2 as a prognostic and immunological biomarker in non-small cell lung cancer. *BMC Pulm Med* 25: 14
13. Chen G, Yang L, Liu G, Zhu Y, Yang F, Dong X, Xu F, Zhu F, Cao C, Zhong D, Li S, Zhang H, Li B (2023) Research progress in protein microarrays: Focussing on cancer research. *Proteomics Clin Appl* 17: e2200036
14. Chen Z, Dodig-Crnković T, Schwenk JM, Tao SC (2018) Current applications of antibody microarrays. *Clin Proteomics* 15: 7
15. Liu L, Li D, Shu J, Wang L, Zhang F, Zhang C, Yu H, Chen M, Li Z, Guo X (2021) Protein Glycopatterns in Bronchoalveolar Lavage Fluid as Novel Potential Biomarkers for Diagnosis of Lung Cancer. *Front Oncol* 10: 568433
16. Gao WM, Kuick R, Orzechowski RP, Misek DE, Qiu J, Greenberg AK, Rom WN, Brenner DE, Omenn GS, Haab BB, Hanash SM (2005) Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis. *BMC Cancer* 5: 110
17. Brezina S, Soldo R, Kreuzhuber R, Hofer P, Gsur A, Weinhäusel A (2015) Immune-Signatures for Lung Cancer Diagnostics: Evaluation of Protein Microarray Data Normalization Strategies. *Microarrays* 4: 162-187
18. Ma T, Wang Y, Jia L, Shu J, Yu H, Du H, Yang J, Liang Y, Chen M, Li Z (2019) Increased expression of core-fucosylated glycans in human lung squamous cell carcinoma. *RSC Adv* 9: 22064-22073
19. Cheung CHY, Juan HF (2017) Quantitative proteomics in lung cancer. *J Biomed Sci* 24: 37
20. Neagu M, Bostan M, Constantin C (2019) Protein microarray technology: Assisting personalized medicine in oncology (Review). *World Acad Sci J* 1: 113-124
21. Shang Z, Niu X, Zhang K, Qiao Z, Liu S, Jiang X, Cao C, Lu S, Xiao H (2019) FGA isoform as an indicator of targeted therapy for EGFR mutated lung adenocarcinoma. *J Mol Med* 97: 1657-1668
22. Cohen AS, Khalil FK, Welsh EA, Schabath MB, Enkemann SA, Davis A, Zhou J-M, Boulware DC, Kim J, Haura EB, Morse DL (2017) Cell-surface marker discovery for lung cancer. *Oncotarget* 8: 113373-113402
23. Tan Q, Wang D, Yang J, Xing P, Yang S, Li Y, Qin Y, He X, Liu Y, Zhou S i wsp. (2020) Autoantibody profiling identifies predictive biomarkers of response to anti-PD1 therapy in cancer patients. *The-ranostics* 10: 6399-6410
24. Cretich M, Damin F, Chiari M (2014) Protein microarray technology: How far off is routine diagnostics? *Analyst* 139: 528-542
25. Schumacher S, Muekusch S, Seitz H (2015) Up-to-Date Applications of Microarrays and Their Way to Commercialization. *Microarrays* 4: 196-213
26. Ali M, Khan SA, Wennerberg K, Aittokallio T (2018) Global proteomics profiling improves drug sensitivity prediction: Results from a multi-omics, pancancer modeling approach. *Bioinformatics* 34: 1353-1362
27. Brittain WJ, Brandsetter T, Prucker O, Rühle J (2019) The Surface Science of Microarray Generation-A Critical Inventory. *ACS Appl Mater Interfaces* 11: 39397-39409
28. Zhou X, Yang CT, Xu Q, Lou Z, Xu Z, Thierry B, Gu N (2019) Gold Nanoparticle Probe-Assisted Antigen-Counting Chip Using SEM. *ACS Appl Mater Interfaces* 11: 6769-6776

Application of analytical protein microarrays in the diagnosis and therapy of lung cancer

Wiktorija Pławecka✉

Faculty of Natural Sciences and Technology, University of Opole, Opole, Poland; Faculty of Biology, University of Warsaw, Warsaw, Poland
✉Corresponding author: wiktoria.plawecka@gmail.com

Keywords: Analytical protein microarrays, lung cancer, biomarkers, cancer diagnostics, personalized medicine

Lung cancer is one of the most commonly diagnosed cancers and a leading cause of cancer-related deaths. Analytical protein microarrays are a promising diagnostic tool, particularly for early disease detection. They enable rapid and sensitive analysis of multiple biomarkers, outperforming traditional methods, and allow for differentiation of lung cancer types, supporting personalized medicine. An additional advantage is the ability to analyze non-invasive samples, such as serum. Despite certain limitations, this technology is developing dynamically. The aim of this thesis is to present the principles of operation, structure, and analytical applications of protein microarrays as advanced diagnostic tools in molecular biology and in the study of protein interactions. The thesis also discusses the benefits resulting from the use of this technology, its advantages over traditional methods, as well as the limitations affecting its practical application in diagnostics and cancer therapy.

