

(12) **Opis zgłoszeniowy wynalazku**  
(z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **440401**

(51) MKP:

(22) Data zgłoszenia: **2022.02.16**

**G01N 33/68** (2006.01)

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.08.21 BUP 34/2023**

(71) Zgłaszający:  
**INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(30) Pierwszeństwo:  
**P.439305 2021.10.25 PL**

(72) Twórca(-y):  
**ANNA PERZANOWSKA-DOMAŃSKA,  
Warszawa, PL  
DOMINIK DOMAŃSKI, Warszawa, PL  
MICHAŁ KISTOWSKI, Puławy, PL  
AGATA MICHALAK, Otwock, PL  
GRZEGORZ WOJTAS, Warszawa, PL  
ALEKSANDRA MARTYNA ROBAK, Abramów, PL  
MICHAŁ DADLEZ, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:  
**Grażyna Wójcik, Warszawa, PL**

(54) Tytuł:

**Panel białkowy do sposobu diagnozowania płynów opłucnowych i sposób analizy płynów opłucnowych do diagnozowania etiologii płynu opłucnowego**

(57) Skrót opisu:

Zgłoszenie dotyczy panelu białkowego do sposobu diagnozowania płynów opłucnowych z zastosowaniem opartej na spektrometrii mas (MS) multipleksowanej celowanej proteomiki z wykorzystaniem metod MS selektywnego, wielokrotnego lub równoległego monitorowania reakcji (SRM, MRM, PRM). Zgłoszenie również dotyczy sposobu analizy płynów opłucnowych do diagnozowania etiologii płynu opłucnowego.

Panel białkowy do sposobu diagnozowania płynów opłucnowych i sposób analizy  
płynów opłucnowych do diagnozowani etiologii płynu opłucnowego

Wynalazek dotyczy panelu białkowego do sposobu diagnozowania płynów opłucnowych z zastosowaniem opartej na spektrometrii mas (MS) multipleksowanej celowanej proteomiki z wykorzystaniem metod MS selektywnego, wielokrotnego lub równoległego monitorowania reakcji (SRM, MRM, PRM). Wynalazek również dotyczy sposobu analizy płynów opłucnowych do diagnozowani etiologii płynu opłucnowego.

Płyn opłucnowy powstaje wskutek nieprawidłowego (nadmiernego) gromadzenia się płynu w jamie opłucnowej. Jego powstawanie najczęściej towarzyszy nowotworom płuca, w tym gruczolakoraka płuca (ADC), raka płaskonabłonkowego (SCC), drobnokomórkowego raka płuca (SCLC), oraz innym nowotworom złośliwym, zapaleniu płuca, gruźliczemu zapaleniu opłucnej, a także niewydolności serca i nerek, jednak znacznie rzadziej występuje również w przebiegu 30 innych jednostek chorobowych (Feller-Kopman i Light, 2018; Mercer i in., 2019). Płyny opłucnowe są skutecznie rozróżniane na podstawie parametrów biochemicznych surowicy krwi i płynu opłucnowego oraz kryteriów Lighta, na płyny przesiękowe zwykle powodowane chorobami układowymi (takimi jak niewydolność serca, nerek, wątroby), i wysiękowe, zwykle powodowane chorobami płuca lub opłucnej (np. rak płuca, gruźlica opłucnej, zapalenie płuca) (Feller-Kopman i Light, 2018).

Istotne wyzwanie diagnostyczne stanowi dalsze różnicowanie wysięków, np. spowodowanych nowotworem od wysięków gruźliczych lub spowodowanych zapaleniem płuca od wysięków gruźliczych, co wynika z podobieństwa ich profili biochemicznych i komórkowych. Na przykład nowotworom i chorobom związanym z przewlekłym stanem zapalnym, takim jak gruźlica, na ogół towarzyszy wysięk limfocytarny, podczas gdy wysięki wywołane zapaleniem płuca i niektóre wysięki gruźlicze, charakteryzują się wysokim poziomem neutrofilii (Mercer i in., 2019).

Ustalenie etiologii płynu jest kluczowe dla wdrożenia odpowiedniego leczenia, jednak obecnie stosowana diagnostyka jest procesem czasochłonnym i często prowadzącym do inwazyjnych procedur, takich jak torakoskopia, których w wielu przypadkach można było uniknąć. Płyn opłucnowy jest rutynowo usuwany podczas

małoinwazyjnej procedury torakocentezy, w celach terapeutycznych (złagodzenia duszności) i diagnostycznych oraz, ze względu na jego umiejscowienie w pobliżu stanu patologicznego, jest idealnym źródłem potencjalnych markerów nowotworu płuca oraz innych chorób płuc i opłucnej o podłożu zapalnym (Mercer i in., 2019).

Należy podkreślić, że obecnie stosowane testy kliniczne pozwalają na diagnostykę bardzo nielicznych stanów patologicznych na podstawie analizy wysięków. Stosowane testy diagnostyczne wysięków, cechują się wysoką specyficnością, lecz ich istotnym ograniczeniem jest niska czułość (Mercer i in., 2019), np. badanie cytologiczne osadu do diagnostyki wysięków nowotworowych ma czułość poniżej 60 %. W przypadku gruźlicy opłucnej na wyniki testów opartych na metodach mikrobiologicznych, będących „złotym standardem”, czeka się aż dwa tygodnie, a ich czułość wynosi poniżej 63 %, podczas gdy czułość szybkiego testu genetycznego w kierunku *Mycobacterium tuberculosis* w płynie opłucnowym (Xpert MTB/RIF) wynosi poniżej 23 % (José M. Porcel, 2016, 2018). Choroby infekcyjne płuc i opłucnej odznaczają się wysoką śmiertelnością, a metoda będąca „złotym standardem” w ich diagnostyce, czyli hodowla patogenów w wysięku, ma czułość poniżej 60 % i wymaga dużo czasu (Mercer i in., 2019). Ponadto testy biochemiczne wysięków nowotworowych i infekcyjnych mogą dawać podobne wyniki. Zostało to doskonale przedstawione obecnie w prospektywnym badaniu, w którym testowano na dużej grupie płynów opłucnowych poziom biomarkerów oraz innych parametrów laboratoryjnych stosowanych w praktyce klinicznej. Na podstawie analizy statystycznej otrzymanych wyników wyłoniono sześć klastrów płynów opłucnowych - nowotworowych, gruźliczych, ropnych, związanych z niewydolnością serca, zapaleniem płuc o różnym stopniu zaawansowania oraz wieloma innymi chorobami (Ferreiro i in., 2020). Jednak wykazano, że płyny o tej samej etiologii często były przydzielane do osobnych grup, podczas gdy występowało grupowanie razem płynów o różnych etiologiach. Powyższe wyniki podkreślają, jak wielkim wyzwaniem jest klasyfikacja płynów opłucnowych i wskazują na ogromne znaczenie w zastosowaniu do tego celu multipleksowanych paneli markerów. W ostatnich latach zaproponowano wiele markerów białkowych stosowanych w praktyce klinicznej oraz potencjalnych markerów, wyłonionych eksperymentalnie, aby wspomóc rozróżnianie etiologii płynów, a tym samym wdrażanie odpowiedniego leczenia (Chen i in., 2014; Liu i in., 2015; José M. Porcel, 2018).

Przykładowo w zgłoszeniu CN107064524A opublikowanym 18 sierpnia 2017 r. opisano układ do wykrywania poziomów IGKC, C9, AHSG i KNG1 do różnicowania płynów opłucnowych gruźliczych i nowotworowych. Jednak w opisie tym testy

immunoenzymatyczne stosuje się zamiennie z oznaczeniem spektrometrią mas. Podobnie w zgłoszeniu CN109490556A opublikowanym 19 marca 2019 r. opisano rozróżnianie płynów opłucnowych gruźliczych i nowotworowych na podstawie poziomów markerów: AGP1, ORM2 i C9.

W opisie patentowym opublikowanym w dn. 2 maja 2013 r. pod nr WO/2013/062515 opisano panel biomarkerów do testów diagnostycznych pod kątem nowotworu płuc obejmujący CA6 jako główny marker nowotworowy we krwi w kombinacji z co najmniej jednym z 22 markerów nowotworowych w tym m. in. YWHAG, MMP12, MMP7, KLK3-SERPINA3, CRP, C9 i inne.

Celowana proteomika oparta na metodach spektrometrii mas znajduje się u progu wejścia do praktyki klinicznej i niezaprzeczalnie jest przyszłością diagnostyki opartej na markerach białkowych (Sabbagh i in., 2016; Zhang i in., 2019). Spektrometrię mas (MS) stosuje się rutynowo w praktyce klinicznej do ilościowego oznaczania małych cząsteczek, a od niedawna pomiar peptydów/białek przy użyciu ukierunkowanych technologii opartych na spektrometrii mas, zastępuje lub uzupełnia przestarzałe techniki oparte na reakcjach z przeciwciałami (Hoofnagle i Roth, 2013; Jannetto i Fitzgerald, 2016; Neubert i in., 2020). Zastosowanie podejść celowanej proteomiki opartej na metodach spektrometrii mas (trybu monitorowania wielu/wybranych, reakcji, MRM/SRM, ang. Multiple/Selected Reaction Monitoring lub trybu równoczesnego monitorowania reakcji, PRM, ang. Parallel Reaction Monitoring) może pomóc w przezwycięzeniu wielu kwestii (reakcje krzyżowe, zmienna specyficzność przeciwciał, autoprzeciwciała wytwarzane w organizmie pacjenta, brak możliwości multipleksowania analiz, wysokie koszty opracowywania metody) towarzyszących stosowaniu testów immunologicznych, które przez wiele lat pozostawały „złotym standardem” do ilościowego oznaczania białek (Hoofnagle i Roth, 2013; Zhang i in., 2019).

Panele MRM/SRM/PRM z zastosowaniem standardów będących peptydami znakowanymi izotopowo, dostarczają specyficznych informacji biologicznych, są tańsze i szybsze w opracowywaniu, zapewniają wysoką specyficzność i precyzję analiz, a także charakteryzują się szerszym zakresem dynamicznym oraz możliwością jednoczesnego pomiaru wielu białek podczas pojedynczej, szybkiej analizy (Sabbagh i in., 2016; Zhang i in., 2019). W pełni zautomatyzowany i certyfikowany analizator kliniczny oparty na MRM-MS (Thermo Scientific™ Cascadion™) został niedawno wprowadzony do analizy związków małocząsteczkowych (Hörber i in., 2020) i następnym krokiem mogłoby być wprowadzenie analizatora klinicznego opartego na MRM-MS do ilościowego oznaczania markerów białkowych w ludzkim materiale biologicznym (Addona i in., 2020; Wright i

Van Eyk, 2017). Stąd w poprzedniej pracy twórcy opracowali test oparty na MRM-MS, do ilościowego oznaczania wielu cytokeratyn nabłonkowych (CK), obecnie stosowany do określania nowotworowych stanów patologicznych, aby pomóc w ustalaniu etiologii płynów opłucnowych.

W retrospektywnym badaniu płynów opłucnowych pobranych od pacjentów podczas torakocentezy, twórcy wykazali, że test według wynalazku skutecznie różnicuje płyny nowotworowe od płynów nienowotworowych (Domanski i in., 2016). Opracowany przez twórców test, stanowi małoinwazyjną analizę płynów opłucnowych, opartą na „płynnej biopsji”, w przeciwieństwie do inwazyjnej procedury wycięcia guza lub biopsji tkanki opłucnej. Umożliwia również klasyfikację różnych podtypów nowotworu płuca i potencjalnie skraca czas potrzebny do postawienia diagnozy i wdrożenia ukierunkowanej terapii, co jest szczególnie ważne dla pacjentów, którzy nie mogą zostać poddani zabiegowi chirurgicznemu (Domanski i in., 2016; Perzanowska i in., 2018).

Obecnie panel MRM został rozszerzony do 53 białek, z wprowadzeniem dodatkowych opracowanych markerów nowotworowych, gruźlicy i stanu zapalnego/infekcji, będące markerami stosowanymi pojedynczo w praktyce klinicznej oraz potencjalnymi markerami, opracowanymi w wyniku doświadczeń, a także opublikowanymi w literaturze naukowej, do klasyfikacji płynów opłucnowych. Celem opracowania testu było zapewnienie optymalnego zestawu markerów (białek i uzyskanych z nich peptydów), które umożliwiają uzyskanie najbardziej wiarygodnych oznaczeń przy użyciu celowanej spektrometrii mas do diagnostyki etiologii płynu opłucnego, a także łatwego przeniesienia testu do standardowego analizatora klinicznego (MRM-MS), nieskomplikowanego protokołu przygotowania próbki do analizy (bez etapów wzbogacania ani deplecji), a będące celem białka zostały wyselekcjonowane ze względu na ich poziom stężenia w płynach opłucnowych (>1 ng/ml), tak aby pomiar ich stężeń nie wymagał stosowania metod wzbogacania.

Istotnym, spośród analizowanych białek w panelu białek jest kadheryna-1 (CDH1) (E-kadheryna) będąca składnikiem połączeń przylegających, odgrywająca ważną rolę w adhezji międzykomórkowej tkanek nabłonka. Jest ona potencjalnym biomarkerem do diagnostyki zaawansowanego raka jelita grubego, w surowicy krwi (Weiß i in., 2011). Odnotowano, że jej poziom jest podwyższony w płynach nowotworowych i została wybrana jako jeden z sześciu najlepszych, potencjalnych biomarkerów oprócz inhibitora proteazy typu Kunitz 1 (SPINT1), mucyny-1 (MUC1/CA 15-3), trombospondyny-4 (THBS4), antygen CD166 (ALCAM) i domeny sushi, czynnika von Willebranda typu A EGF i białka 1 zawierającego domenę pentraksyny (SVEP1) (C.-D. Chen i in., 2014).

Chen i in. przeprowadzili analizę MRM na 82 płynach opłucnowych i zastosowali etap wzbogacenia próbki. Odnotowali SPINT1 (AUC: 0,916), CDH1 (AUC: 0,815) i MUC1 (AUC: 0,807) jako główne markery pozwalające na rozróżnienie płynów nowotworowych, spowodowanych wyłącznie przez gruczolakoraka. Ponadto, jako kontrolę w tym badaniu zastosowali płyny gruczlicze, płyny parapneumoniczne i paranowotworowe (płyny opłucnowe związane z nowotworem płuca, ale bez stwierdzonych przerzutów), co zapewne podwyższyło uzyskane wartości AUC. Na podstawie modelu regresji logistycznej wybrali najlepszy panel 3-markerowy, składający się z SPINT1, SVEP1 i THBS4 (AUC: 0,951).

SVEP1 jest ważną cząsteczką adhezyjną komórek, regulującą adhezję międzykomórkową, uczestniczącą w progresji raka (L. Chen i in., 2020; Shur i in., 2007).

THBS4 jest zewnątrzkomórkowym białkiem wiążącym wapń, biorącym udział w interakcjach komórka-komórka i komórka-macierz, i stwierdzono jego nadekspresję w zrębie nowotworowym gruczolakoraka żołądka typu rozlanego wydzielanym przez fibroblasty związane z rakiem oraz w podścielisko inwazyjnego raka sutka (Förster i in., 2011; McCart Reed i in., 2013).

MUC1, znany również jako antygen nowotworowy 15-3 (CA 15-3), jest dużą glikoproteiną przebłonową, ulegającą ekspresji na powierzchni wierzchołkowej najprostszych komórek wydzielniczych nabłonka, która ulega autoodszczerpieniu na dwie podjednostki (MUC1-N i MUC1-C) (Hatstrup i Gendler, 2008), a jego nadekspresja występuje w różnych nowotworach, w tym nowotworze płuca (Nath i Mukherjee, 2014). Krążący MUC1-N stosuje się jako serologiczny marker (CA 15-3) w praktyce klinicznej do monitorowania raka sutka (Kufe, 2009). CA 15-3 stosowany w praktyce klinicznej, oceniano w panelu wraz z trzema innymi markerami nowotworowymi (CEA, CA 125 i CYFRA 21-1 (CK-19)) pod kątem użyteczności do diagnostyki płynów nowotworowych, a CA 15-3 analizowany samodzielnie, miał najlepszą spośród nich czułość na poziomie 30 % (przy 100 % swoistości). Połączenie wszystkich czterech markerów razem dało czułość 54 % (José Manuel Porcel i in., 2004).

Hemopeksyna (HPX) jest powszechnie występującą glikoproteiną osocza wiążącą hem, z tą ważną fizjologiczną rolą wymaganą do zapobiegania uszkodzeniom oksydacyjnym podczas hemolizy (Tolosano i Altruda, 2002). Stwierdzono, że poziom HPX był wyższy w płynach nowotworowych (gruczolakorak/ niedrobnokomórkowy rak płuca) w porównaniu z płynami gruczliczymi/ parapneumonicznymi (Rodríguez-Piñeiro i in., 2010; Z. Wang i in., 2012), ale jest to także białko reagujące w ostrej fazie, indukowane po zapaleniu (Tolosano i Altruda, 2002).

Mezotelina (MSLN) jest normalnie produkowany głównie przez komórki mezotelialne, lecz także jest antygenem związanym z nowotworem, ulegającym nadekspresji na różnych złośliwych komórkach nowotworowych, w tym złośliwym międzybłoniaku opłucnej (Creaney i Robinson, 2017). Jest to marker surowicy stosowany do monitorowania międzybłoniaka opłucnej. Badania wykazują także jego wyższe poziomy w płynach opłucnowych u pacjentów z złośliwym międzybłoniakiem opłucnej, natomiast odnotowano także wiele fałszywie dodatnich wyników w innych płynach nowotworowych (Hooper i in., 2013; Miettinen i Sarlomo-Rikala, 2003). Analiza guzów płuca wykazała, że MSLN ulegał nadekspresji w połowie gruczolakoraków, w rakach wielkokomórkowych i raku płaskonabłonkowym, ale nadekspresja nie występowała w raku drobnokomórkowym (Miettinen i Sarlomo-Rikala, 2003).

WARS jest indukowaną interferonem- $\gamma$ , cytoplazmatyczną formą syntetazy tryptofanylo-tRNA. WARS była podwyższona w ludzkich makrofagach zakażonych *Mycobacterium tuberculosis* oraz w surowicy krwi pacjentów z aktywną gruźlicą płuc, będąc jednym z trzech najlepszych, potencjalnych biomarkerów gruźlicy (De Groote i in., 2017; Diaz i in., 2016).

Chemokina CXCL10 (CXCL10), znana również jako białko indukowane interferonem- $\gamma$  10 kDa (IP-10), jest cytokiną należącą do rodziny chemokin CXC (M. Liu i in., 2011). Przyciąga do miejsc objętych stanem zapalnym monocyty i aktywowane limfocyty T, i sprzyja selektywnemu wzmocnieniu odpowiedzi Th1 i zwiększonej produkcji IFN- $\gamma$ . Podwyższony poziom CXCL10 w płynach gruźliczych, podobnie jak ceaminaza adenozynowa ADA i IFN- $\gamma$ , wskazuje na ostrą chorobę i sugeruje się jej użycie jako dodatkowego markera diagnostycznego (K.-Y. Chen i in., 2016; Dheda i in., 2009; Roofchayee i in., 2021). Siedem wcześniejszych badań, w których stężenie CXCL10 mierzono metodą ELISA, wykazało średnią czułość 84 % i swoistość 90 % w identyfikacji płynu gruźliczego (José M. Porcel, 2016).

ADA reprezentowana przez dwa izoenzymy (ADA1 i ADA2), bierze udział w metabolizmie puryn i katalizuje deaminację adenozyny do inozyny, cząsteczki sygnałowej, która ma kluczowe znaczenie dla rozwoju układu limfatycznego (Cristalli i in., 2001). ADA1 stanowi większość wewnątrzkomórkowej aktywności ADA, podczas gdy ADA2 jest wydzielana specyficznym przez układ komórek monocytów-makrofagów oraz limfocyty T i jest dominującym izoenzymem w płynach gruźliczych (Bielsa i in., 2013; Cristalli i in., 2001; Zemlin i in., 2009). Przydatność pomiaru całkowitej aktywności ADA w diagnostyce gruźlicy opłucnej została po raz pierwszy opisana w 1978 roku i do dziś pozostaje najbardziej wyspecjalizowanym biomarkerem płynu gruźliczego (José M.

Porcel, 2016). Z pięciu metaanaliz wynika, że pomiar aktywności ADA w płynie opłucnowym ma czułość 92 % i swoistość 90 % (José M. Porcel, 2016). Wykazano, że pomiar aktywności ADA2 jest lepszy niż pomiar całkowitej aktywności (Zemlin i in., 2009), jednak w testach stosowanych w praktyce klinicznej nadal mierzy się całkowitą aktywność ADA.

Białko S100A9 (S100A9) jest białkiem wiążącym wapń, które występuje głównie jako heterodimer S100A8/A9 (kalprotektyna) i jest wydzielane przez neutrofile i monocyty modulując procesy zapalne poprzez stymulowanie rekrutacji leukocytów i indukowanie wydzielania cytokin, mające potencjał jako marker diagnostyczny dla chorób związanych ze stanem zapalnym (S. Wang i in., 2018).

Surowicze białko amyloidu P (APCS) (składnik surowiczy amyloidu P lub SAP) jest białkiem osocza, które podobnie jak białko C-reaktywne (CRP) należy do rodziny pentraksyn białek wiążących ligandy zależne od wapnia i jest związane z kilkoma patogennymi stanami amyloidu (Pepys, 2018). Hamuje on przemieszczanie się neutrofilii do tkanek, sprzyja rozwiązywaniu stanów zapalnych i zwłóknienia, promuje fagocytozę i reguluje różnicowanie makrofagów (Pilling i Gomer, 2018). Wyższe poziomy S100A9 i APCS wykryto w płynach parapneumonicznych (a także w płynach gruźliczych w przypadku APCS) w porównaniu z płynami nowotworowymi (gruczolakoraka) (Z. Wang i in., 2012).

CRP jest białkiem ostrej fazy zapalenia, wykorzystywanym w praktyce klinicznej jako marker infekcji i incydentów sercowo-naczyniowych (Sproston i Ashworth, 2018). Był on podwyższony w płynach infekcyjnych, w tym gruźliczych, parapneumonicznych i ropniakach, w porównaniu do płynów nowotworowych i przesieków (Izhakian i in., 2016; J.M. Porcel i in., 2009; Watanabe i in., 2018). Metaanaliza 18 publikacji wykazała rozsądną zdolność diagnostyczną CRP dla płynów parapneumonicznych (AUC: 0,88, czułość 80 %, swoistość 82 %) (Li i in., 2019).

Wimentyna (VIM) to pośrednie białko filamentowe typu III zaangażowane w utrzymywanie integralności komórkowej i inne procesy, takie jak przyłączanie, migracja i sygnalizacja komórek (Ramos i in., 2020; Satelli i Li, 2011). Klasycznie, jest markerem przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT), wiąże się ze złym rokowaniem i stwierdzono jego nadekspresję w różnych nowotworach nabłonkowych, w tym raku płuca (Satelli i Li, 2011). VIM był podwyższony na powierzchni ludzkich monocytów zakażonych *M. tuberculosis* i jako ligand pośredniczył w ich lizie przez komórki NK (Diaz i in., 2016; Garg i in., 2006).

Galektyna 1 (LGALS1) to lektyna o funkcjach przeciwzapalnych (Camby i in., 2006; Sundblad i in., 2017). Jej nadekspresja została zaobserwowana w ostrym i przewlekłym zapaleniu, ale także w kilku typach nowotworów, w tym raku płuca, gdzie może wpływać na progresję nowotworu (Astorgues-Xerri i in., 2014; Sundblad i in., 2017). Mundt i in. wykazali nadekspresję LGALS1 w płynach związanych z gruczolakorakiem w porównaniu z płynami związanymi z międzybłoniakiem, podczas gdy Javadi i in. stwierdzili coś wprost przeciwnego, przy czym obaj twierdzili, że LGALS1 jest potencjalnym markerem międzybłoniaka (Javadi i in., 2020; Mundt i in., 2014).

Metaloproteinaza 9 (MMP9, żelatynaza B) stymuluje lub hamuje proces degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), a jej nadekspresja jest związana z różnymi nowotworami, a także z ostrymi i przewlekłymi chorobami zapalnymi oraz infekcjami (Mondal i in., 2020). MMP9 było podwyższone w płynach gruźliczych w porównaniu z przesiękami i płynami nowotworowymi, i było wytwarzane przez komórki nabłonkowe w ziarniniakach (Park i in., 2005; Jose M. Porcel i in., 2016; Sheen i in., 2009).

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest niezbędnym enzymem cytozolowym, odwracalnie przekształcającym pirogronian w mleczan. Jest to homo- lub heterotetramer, tworzący pięć izoenzymów, różniących się udziałem podjednostek LDHA i LDHB oraz rozmieszczeniem tkankowym (Urbańska i Orzechowski, 2019). LDH jest uwalniany przez uszkodzone komórki, a całkowity LDH w surowicy jest bardzo czułym, ale niespecyficznym markerem wielu stanów chorobowych (Erez i in., 2014). Aktywność LDH stosuje się do różnicowania przesięku i wysięku opłucnowego, przy czym wysięki, zwłaszcza skomplikowane wysięki parapneumoniczne i gruźlicze, charakteryzują się wyższym LDH (Feller-Kopman i Light, 2018; José M. Porcel i Light, 2006).

Ostatecznie opracowany test MRM obejmujący panel 34 markerów białkowych zastosowano do analizy 209 płynów opłucnowych o znanej etiologii, w celu oceny użyteczności zastosowania tego sposobu do klasyfikacji płynów nowotworowych, gruźliczych, infekcyjnych oraz spowodowanych niewydolnością narządów (innych niż płuca). Stosując model klasyfikacji wieloklasowej, test według wynalazku wykazuje wysoką zdolność do rozróżniania wyżej wymienionych typów płynów opłucnowych, a szczególnie płynów nowotworowych i gruźliczych, których różnicowanie jest bardzo istotne z medycznego punktu widzenia. Co więcej test umożliwi odróżnienie płynów nowotworowych i infekcyjnych od płynów spowodowanych niewydolnością narządów, stanowiących głównie przesięki, i obejmujących szeroką gamę etiologii, które dotychczas były pomijane przez wiele grup badawczych i często obniżały swoistość proponowanych testów lub biomarkerów (Pan i in., 2020; Jose M. Porcel i in., 2016).

### Streszczenie wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest panel białkowy składający się z markerów białkowych i odpowiadających im peptydów wymienionych w poniższej tabeli 1.

Panel białkowy według wynalazku jest przeznaczony do sposobu *in vitro* diagnozowania płynów opłucnowych z zastosowaniem opartej na spektrometrii mas (MS) multipleksowanej proteomiki celowanej z wykorzystaniem metod MS selektywnego, wielokrotnego lub równoległego monitorowania reakcji (SRM, MRM, PRM).

W panelu według wynalazku wykryty i oznaczony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: kadheryna-1 (CDH1), trombospondyna-4 (THBS4), mezotelina (MSLN), mucyna-1 (MUC1/CA 15-3), domena sushi, czynnik von Willebranda typu A EGF i białko 1 zawierające domenę pentraksyny (SVEP1), inhibitor proteazy typu Kunitz 1 (SPINT1), hemopeksyna (HPX), antygen CD166 (ALCAM), kallistatyna (SERPINA4), keratyna 8 typu II cytoszkieletu (CK-8), keratyna 18 typu I cytoszkieletu (CK-18), keratyna 19 typu I cytoszkieletu (CK-19), wskazuje na płyn nowotworowy, czyli płyn związany z nowotworem.

W panelu według wynalazku wykryty i oznaczony ilościowo, zwiększony poziom następujących białek lub odpowiadających im peptydów w płynie opłucnowym: CDH1, MUC1, THBS4, MSLN, HPX wskazuje na płyn nowotworowy. Korzystnie w panelu według wynalazku wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom lub odpowiadających im peptydów CDH1 w płynie opłucnowym wskazuje na płyn nowotworowy.

W panelu według wynalazku wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: deaminazy adenozyliny 2 (ADA2), chemokiny CXCL10 (CXCL10) i syntetazy tryptofanylo-tRNA, cytoplazmatycznej (WARS) wskazuje na płyn gruźliczy, czyli płyn opłucnowy spowodowany zapaleniem opłucnej w wyniku infekcji *Mycobacterium tuberculosis*. Korzystnie w panelu według wynalazku wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom ADA2 i jej peptydów w płynie opłucnowym wskazuje na płyn gruźliczy.

W panelu według wynalazku wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: wimentyny (VIM), galektyny 1 (LGALS1), osoczowego białka amyloidu P (APCS), białka S100A9, metaloproteinazy 9 (MMP9), dehydrogenazy mleczanowej A (LDHA) i białka C-reaktywnego (CRP), wskazuje na płyn parapneumoniczny, inaczej inny płyn infekcyjny.

Korzystnie, w panelu według wynalazku wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: CRP, S100A9, VIM, a korzystniej CRP i S100A9, wskazuje na inny płyn infekcyjny.

W panelu według wynalazku wykryty i określony ilościowo, zmieniony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: HPX, LDHA, dehydrogenazy mleczanowej B (LDHB), składowych dopełniacza C3, C9, SVEP1 wskazuje na płyn łagodny, wynikający z chorób innych niż nowotwory i infekcje.

Korzystnie w panelu według wynalazku wykryty i określony ilościowo, obniżony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: LDHA, LDHB, C3, C9, HPX wskazuje na płyn łagodny. Korzystniej w panelu według wynalazku wykryty i określony ilościowo, obniżony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: LDHA i C9, wskazuje na płyn łagodny.

Przedmiotem wynalazku jest panel białkowy i sposób, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo markery białkowe o sekwencjach wskazanych jako sekwencjach o numerach: 1 i 2, 4, 5 i 7, 8, 10 i 11, 14, 16 i 17, 18-20, 23, 24-26, 29, 30, 33-35, 36 i 37, 40 i 42, 44 i 45, 48, 50 i 51, 54 i 57, 58, 60 i 61, 63, 67-70, 71, 72 i 75, 79, 80-83, 84-86, 87-89, 90 i 91, 92-94, 95 i 97, 98-102 oraz 104-108

Przedmiotem wynalazku jest również sposób *in vitro* analizy płynu opłucnowego do diagnozowania jego etiologii, w którym to sposobie wykrywa się i oznacza ilościowo panel białek składający się z markerów białkowych i odpowiadających im peptydów wymienionych w tabeli 1 w płynie opłucnowym pobranym od pacjenta, oraz w którym wykrywanie i oznaczenie ilościowe przeprowadza się przy użyciu opartej na spektrometrii mas multipleksowej ukierunkowanej proteomiki, w której obecność lub zmiana poziomu białka lub jego odpowiedniej kombinacji peptydowej, wskazuje na etiologię płynu opłucnowego.

W sposobie według wynalazku analizę płynu opłucnowego przeprowadza się przy użyciu opartej na spektrometrii mas (MS) multipleksowanej celowanej proteomiki z zastosowaniem metod MS selektywnego, wielokrotnego lub równoległego monitorowania reakcji (SRM, MRM, PRM).

W sposobie według wynalazku wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym markerów białkowych i odpowiadających im peptydów w porównaniu z poziomem stężenia białek lub peptydów odniesienia oznaczonym w grupie odniesienia.

W sposobie według wynalazku wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: CDH1, THBS4, MSLN, MUC1/CA 15-3, SVEP1, SPINT1, HPX, ALCAM, SERPINA4, CK-8, CK-18, CK-19, przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na płyn nowotworowy. Korzystnie w sposobie według wynalazku wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: CDH1, MUC1, THBS4, MSLN, HPX, przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na płyn nowotworowy.

W sposobie według wynalazku wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym CDH1 i jej odpowiednich peptydów, przy czym obecność i zwiększony poziom CDH1 wskazuje na płyn nowotworowy.

W sposobie według wynalazku wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: ADA2, CXCL10 i WARS, przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na płyn gruźliczy, czyli płyn opłucnowy spowodowany zapaleniem opłucnej w wyniku infekcji *Mycobacterium tuberculosis*. Korzystnie w sposobie według wynalazku wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu ADA2 w płynie opłucnowym, przy czym jej obecność i zwiększony poziom wskazuje na płyn gruźliczy.

W sposobie według wynalazku wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: VIM, LGALS1, APCS, S100A9, MMP9, LDHA i CRP, przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na płyn parapneumoniczny, inaczej inny płyn infekcyjny. Korzystnie w sposobie według wynalazku wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: CRP, S100A9, VIM, przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na inny płyn infekcyjny. Korzystnie obecność i zwiększony poziom CRP, S100A9 i odpowiadających im peptydów wskazuje na inny płyn infekcyjny.

W sposobie według wynalazku wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: HPX, LDHA, LDHB, C3, C9, SVEP1, przy czym ich obecność i obniżony poziom wskazuje na płyn łagodny, wynikający z chorób innych niż nowotwory i infekcje. Korzystnie w sposobie według wynalazku wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: LDHA, LDHB, C3, C9, HPX, przy czym ich obecność i obniżony poziom

wskazuje na płyn łagodny. Korzystniej obecność i obniżony poziom LDHA i C9, i odpowiadających im peptydów wskazuje na płyn łagodny.

Przedmiot wynalazku został przedstawiony jako panel markerów białkowych i odpowiadających im peptydów wymienionych w tabeli 1.

**Tabela 1: Markery białkowe wykryte i zmierzone ilościowo w płynie opłucnowym spośród 53 białek testowanych w tym badaniu.** Obejmują one biomarkery stosowane w praktyce klinicznej oraz potencjalne biomarkery opublikowane w literaturze naukowej o potencjale diagnostycznym do określania etiologii płynów opłucnowych, wykrywania nowotworów lub chorób infekcyjnych w badaniach osocza krwi, przy użyciu biochemicznych lub opartymi na przeciwciałach testach diagnostycznych, lub przy użyciu technik badawczych, takich jak globalna i ukierunkowana spektrometria mas lub metody jedno- i multi-pleksowe oparte na przeciwciałach. Dwadzieścia dziewięć białek (ADA1 i ADA2 (reprezentujące ADA), C3, C9, CEA/CEACAM5, CK-6, CK-7, CK-8, CK-14, CK-17, CK-18, CK-19, CRP, GRP, IFNG, LDHA, LDHB i LDHC (reprezentujące LDH), MSLN, MUC-1/CA 15-3, MUC-16/CA-125, NSE, CDH1, MMP9, EPCAM, VIM, WFDC2/HE4, SPB3 /SCCA-1 i SPB4/SCCA-2 (reprezentujące SCCA)) reprezentuje markery stosowane w praktyce klinicznej. Trzydzieści dwa, trzynaście i osiem białek to odpowiednio potencjalne lub powszechnie stosowane markery nowotworowe, grucznicze i infekcji lub stanu zapalnego. Pogrubienie peptydu wskazuje na najlepsze peptydy użyte w teście MWU i indywidualnych krzywych ROC (fig. 4).

Nazwa białka (skrót używany w tekście) (inne nazwy) [nazwa genu, identyfikator UniProt]	Peptyd mierzony przez MRM (Pozycja peptydu w białku. Pogrubienie wskazuje peptydy użyte w teście MWU i indywiduowanych krzywych ROC)	Zgłaszany zakres stężeń w płynie opłucnowym	Opis
<b>Kadheryna-1 (CDH1)</b> (Kadheryna nabłonkowa, E-kadheryna, Cadherin-1, Epithelial cadherin, E-cadherin) [CDH1, P12830] Długość: 882 aa, Masa (Da): 97456	<b>NTGVISVVTTGLDR</b> (322-335) SEQ ID NO: 1 <b>GQVPENEANVVITLK</b> (382-397) SEQ ID NO: 2 <b>GLDARPEVTR</b> (775-784) SEQ ID NO: 3	408 - 872 ng/ml	Potencjalny marker płynu nowotworowego. (C.-D. Chen i in., 2014). Marker stosowane w praktyce klinicznej do różnicowania raka sutka. (Anatomic Pathology Lab Instruments by Roche Tissue Diagnostics, n.d.).
<b>Antygen CD166 (ALCAM)</b> (CD166 antigen) [ALCAM, Q13740] Długość: 583 aa, Masa (Da): 65102	<b>YEKPDGSPVFIAR</b> (58-71) SEQ ID NO: 4 <b>VLHPLEGAVVHFK</b> (176-189) SEQ ID NO: 5 EGDNITLK (262-269) SEQ ID NO: 6 <b>ESLTLIVEGKQIK</b> (406-419) SEQ ID NO: 7	478 - 913 ng/ml	Potencjalny marker płynu nowotworowego. (C.-D. Chen i in., 2014).
<b>Hemopeksyna (HPX)</b> (Hemopexin) [HPX, P02790] Długość: 462 aa, Masa (Da): 51676	<b>NFPSPVDAAFR</b> (92-102) SEQ ID NO: 8 <b>LYLVQGTQVYVFLTK</b> (318-332) SEQ ID NO: 9 <b>GGYTLVSGYPK</b> (333-343) SEQ ID NO: 10 <b>SGAQAATWTELPWPEK</b> (387-402) SEQ ID NO: 11	-	Potencjalny marker płynu nowotworowego. (Rodríguez-Piñero i in., 2010; Z. Wang i in., 2012).
<b>Cytokeratyna 6 (CK-6)</b>	<b>SGFSSVSVSR</b> (KRT6A: 31-40) SEQ ID NO: 12	0 - 12	Potencjalny marker płynu

<p>(Keratyna 6 typu II cytoszkieletu, Keratin type II cytoskeletal 6, cytokeratin-6) [KRT6A, P02538], Długość: 564 aa, Masa (Da): 60 045, [KRT6B, P04259], Długość: 564 aa, Masa (Da): 60 067, [KRT6C, P48668], Długość: 564 aa, Masa (Da): 60025</p>	<p>ATGGGLSSVGGGSSTIK (KRT6B: 534-550) SEQ ID NO: 13 <b>ADLTDEINFLR</b> (KRT6 A,B,C: 288-299) SEQ ID NO: 14</p>	<p>ng/mg białka</p>	<p>nowotworowego. (Domanski i in., 2016). Marker nowotworowy raka stosowany w patologii (Moll i in., 2008).</p>
<p><b>Cytokeratyna 7 (CK-7)</b> (Keratyna 7 typu II cytoszkieletu, Keratin type II cytoskeletal 7, cytokeratin-7) [KRT7, P08729] Długość: 469 aa, Masa (Da): 51386</p>	<p>LPDIFEAQIAGLR (137-149) SEQ ID NO: 15 <b>VDALNDEINFLR</b> (215-226) SEQ ID NO: 16 <b>FETLQAQAGK</b> (287-296) SEQ ID NO: 17</p>	<p>0 - 24 ng/mg białka</p>	<p>Potencjalny marker płynu nowotworowego. (Domanski i in., 2016). Marker nowotworowy raka stosowany w patologii (Moll i in., 2008).</p>
<p><b>Cytokeratyna 8 (CK-8)</b> (Keratyna 8 typu II cytoszkieletu, Keratin type II cytoskeletal 8, cytokeratin-8) [KRT8, P05787] Długość: 483 aa, Masa (Da): 53704</p>	<p><b>LEGLTDEINFLR</b> (214-225) SEQ ID NO: 18 <b>YEELQSLAGK</b> (286-295) SEQ ID NO: 19 <b>LSELEAALQR</b> (353-362) SEQ ID NO: 20</p>	<p>0 - 136 ng/mg białka</p>	<p>Potencjalny marker płynu nowotworowego. (Domanski i in., 2016). Marker nowotworowy raka stosowany w patologii i marker serologiczny do monitorowania terapii (Barak i in., 2004; Moll i in., 2008).</p>

<p><b>Cytokeratyna 18 (CK-18)</b> (Keratyna 18 typu I cytoszkieletu, Keratin type I cytoskeletal 18, cytokeratin-18) [KRT18, P05783] Długość: 430 aa, Masa (Da): 48058</p>	<p>DWSHYFK (125-131) SEQ ID NO: 21 AQIFANTVDNAR (138-149) SEQ ID NO: 22 AQYDELAR (254-261) SEQ ID NO: 23</p>	<p>0 - 42 ng/mg białka</p>	<p>Potencjalny marker płynu nowotworowego. (Domanski i in., 2016). Marker nowotworowy raka stosowany w patologii i marker serologiczny do monitorowania terapii (Barak i in., 2004; Moll i in., 2008).</p>
<p><b>Cytokeratyna 19 (CK-19)</b> (Keratyna 19 typu I cytoszkieletu, Keratin type I cytoskeletal 19, cytokeratin-19) [KRT19, P08727] Długość: 400 aa, Masa (Da): 44106</p>	<p>FGPGVAFR (25-32) SEQ ID NO: 24 AALEDTLAETEAR (318-330) SEQ ID NO: 25 SLLEGQEDHYNLSASK (382-398) SEQ ID NO: 26</p>	<p>0 - 41 ng/mg białka</p>	<p>Potencjalny marker płynu nowotworowego. (Domanski i in., 2016). Marker nowotworowy raka stosowany w patologii i marker serologiczny do monitorowania terapii (Barak i in., 2004; Moll i in., 2008).</p>
<p><b>Inhibitor proteazy typu Kunitz 1 (SPINT1)</b> (Kunitz-type protease inhibitor 1) [SPINT1, O43278] Długość: 529 aa, Masa (Da): 58398</p>	<p>EGFINYLTR (135-143) SEQ ID NO: 27 TQFGGSGIPK (154-164) SEQ ID NO: 28 YTSGFDELQR (372-381) SEQ ID NO: 29</p>	<p>19 - 63 ng/ml</p>	<p>Potencjalny marker płynu nowotworowego. (C.-D. Chen i in., 2014).</p>
<p><b>Mucyna-1 (MUC1)</b> (antygen nowotworowy 15-3, CA 15-3, Mucin-1, Cancer antigen 15-3) [MUC1, P15941]</p>	<p>QGGFLGLSNIK (1083-1093) SEQ ID NO: 30 EGTINVHDVETQFNQYK (1109-1125) SEQ ID NO: 31 NYGQLDIFPAR (1190-1200) SEQ ID NO: 32</p>	<p>352 - 4140 ng/ml</p>	<p>Potencjalny marker płynu nowotworowego. (C.-D. Chen i in., 2014; José Manuel Porcel i in., 2004). Marker stosowany w praktyce</p>

Długość: 1255 aa, Masa (Da): 122102				klinicznej do monitorowania terapii raka sutka (Kufe, 2009; Nath i Mukherjee, 2014).
<b>Czynnik pochodzący z nabłonka pigmentowego (SERPINF1)</b> (Pigment epithelium-derived factor) [SERPINF1, P36955] Długość: 418 aa, Masa (Da): 46312	<b>LAAAVSNFGYDLYR</b> (54-67) SEQ ID NO: 33 <b>LQSLFDSPDFSK</b> (334-345) SEQ ID NO: 34 <b>DTDTGALLFIGK</b> (400-411) SEQ ID NO: 35	-		Potencjalny marker płynu nowotworowego. (Z. Wang i in., 2012).
<b>Domena Sushi, czynnik von Willebranda typu A, EGF i białko zawierające domenę pentraksyny 1 (SVEP1)</b> (Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1) [SVEP1, Q4LDE5] Długość: 3 571 aa, Masa (Da): 390170	<b>LLSDFPVPVPTATR</b> (109-121) SEQ ID NO: 36 <b>GAFQQAQILLHAR</b> (171-184) SEQ ID NO: 37 <b>LLQTLETITNK</b> (942-952) SEQ ID NO: 38	537 - 1038 ng/ml		Potencjalny marker płynu nowotworowego. (C.-D. Chen i in., 2014).
<b>Trombospondyna-4 (THBS4)</b> (Thrombospondin-4) [THBS4, P35443]	<b>SSATIFGLYSSTDNSK</b> (70-85) SEQ ID NO: 39 <b>AFAGPSQKPETIELR</b> (159-173) SEQ ID NO: 40 <b>KPQDFLEELK</b> (178-187) SEQ ID NO: 41	22 - 55 ng/ml		Potencjalny marker płynu nowotworowego. (C.-D. Chen i in., 2014).

Długość: 961 aa, Masa (Da): 105869	<b>NSLWHTGDTSDQVR</b> (851-864) SEQ ID NO: 42		
<b>Galektyna 1 (LGALS1)</b> (Galactin-1) [LGALS1, P09382] Długość: 135 aa, Masa (Da): 14716	<b>SFVLNLGK</b> (30-37) SEQ ID NO: 43 <b>DGGAWGTEQR</b> (65-74) SEQ ID NO: 44 <b>LPDGYEFK</b> (101-108) SEQ ID NO: 45	-	Potencjalny marker płynu międzybłoniaka opłucnej (Javadi i in., 2020; Mundt i in., 2014).
<b>Mezotelina (MSLN)</b> (Mesothelin) [MSLN, Q13421] Długość: 630 aa, Masa (Da): 68986	<b>GLLPVLGQPIIR</b> (250-261) SEQ ID NO: 46 <b>EIDSLIFYK</b> (310-319) SEQ ID NO: 47 <b>VNAIPFTYEQLDVLK</b> (339-353) SEQ ID NO: 48 <b>IQSFLGGAPTEDLK</b> (504-517) SEQ ID NO: 49 <b>TDAVLPLTVAEVQK</b> (536-549) SEQ ID NO: 50 <b>LLGPHVEGLK</b> (550-559) SEQ ID NO: 51	6 - 40 nM	Potencjalny marker płynu międzybłoniaka opłucnej (Hooper i in., 2013). Marker surowicy stosowany w praktyce klinicznej do monitorowania pacjentów z międzybłoniakiem (Creaney i Robinson, 2017).
<b>Deaminaza adenozyny 2 (ADA2)</b> (Adenosine deaminase 2) [ADA2, Q9NZK5] Długość: 511 aa, masa (Da): 58934	<b>TLIFPPSMHFFQAK</b> (77-90) SEQ ID NO: 52 <b>LLPVYELSGEHHDEEWSVK</b> (249-267) SEQ ID NO: 53 <b>FVETHPEFIGIK</b> (276-287) SEQ ID NO: 54 <b>LPYFFHAGETDWWQTSIDR</b> (351-369) SEQ ID NO: 55 <b>IGHGFALSK</b> (382-390) SEQ ID NO: 56 <b>DIPIEVCPISNQVLK</b> (402-416) SEQ ID NO: 57	-	Klinicznie mierzona całkowita aktywność deaminazy adenozyny (ADA) w płynie opłucnowym jest markerem gruźliczego zapalenia opłucnej, przy czym izoenzym ADA2 wykazuje lepsze rozróżnianie (José M. Porcel, 2016; Zemlin i in., 2009).

<p><b>Składowa C9 dopelniacza (C9)</b> (Complement component C9) [C9, P02748] Długość: 559 aa, Masa (Da): 63173</p>	<p><b>TEHYEEQIEAFK</b> (214-225) SEQ ID NO: 58 <b>TSNFNAAISLK</b> (232-242) SEQ ID NO: 59 <b>LSPIYNLVPVK</b> (473-483) SEQ ID NO: 60 <b>AIEDYINEFSVR</b> (497-508) SEQ ID NO: 61</p>	-	Potencjalny serologiczny marker gruźlicy (De Grootte i in., 2017). Marker stanu zapalnego stosowany w praktyce klinicznej.
<p><b>Chemokina CXCL10 (CXCL10)</b> (10 kDa białko indukowane interferonem gamma, IP-10, 10 kDa interferon gamma-induced protein) [CXCL10, P02778] Długość: 98 aa, Masa (Da): 10881</p>	<p><b>CTCISISQPVNPR</b> (30-43) SEQ ID NO: 62 <b>LEIIPASQFCPR</b> (48-59) SEQ ID NO: 63 <b>VEIILATMK</b> (60-67) SEQ ID NO: 64 <b>CLNPESK</b> (74-80) SEQ ID NO: 65</p>	670 - 4469 pg/ml	Potencjalny marker płynu gruźliczego (K.-Y. Chen i in., 2016; Roofchayee i in., 2021).
<p><b>Gelsolin (GSN)</b> [GSN, P06396] Długość: 782 aa, Masa (Da): 85698</p>	<p><b>EVQGFESATFLGYFK</b> (148-161) SEQ ID NO: 66 <b>HVVPNEVVVQR</b> (178-188) SEQ ID NO: 67 <b>QTQVSVLPEGGETPLFK</b> (374-390) SEQ ID NO: 68 <b>AGALNSNDAFVLK</b> (585-597) SEQ ID NO: 69 <b>TGAQELLR</b> (616-623) SEQ ID NO: 70</p>	-	Potencjalny marker płynu gruźliczego (Lee i in., 2017). Potencjalny serologiczny marker gruźlicy (De Grootte i in., 2017).
<p><b>Kalistatyna (SERPINA4)</b> (Kallistatin) [SERPINA4, P29622] Długość: 427 aa, Masa (Da): 48542</p>	<p><b>IAPANADFAFR</b> (51-61) SEQ ID NO: 71 <b>VGSALFLSHNLK</b> (139-150) SEQ ID NO: 72 <b>LFHTNFYDVTGTLQLINDHVK</b> (167-187) SEQ ID NO: 73</p>	-	Potencjalny serologiczny marker gruźlicy (De Grootte i in., 2017).

	FSISGSYVLDQILPR (321-335) SEQ ID NO: 74 <b>LGFTDLFSK</b> (336-344) SEQ ID NO: 75 ATLDVDEAGTEAAAAATSF AIK (366-386) SEQ ID NO: 76			Potencjalny marker płynu gruźliczego, i marker stanu zapalnego stosowany w praktyce klinicznej (Park i in., 2005; Jose M. Porcel i in., 2016; Sheen i in., 2009).
<b>Metaloproteinaza 9 (MMP9)</b> (Żelatynaza B, Gelatinase B, Matrix metalloproteinase-9) [MMP9, P14780] Długość: 707 aa, Masa (Da): 78458	AVIDDAFAR (135-143) SEQ ID NO: 77 AFALWSAVTPLTFTR (144-158) SEQ ID NO: 78 <b>LGLGADVAQVTGALR</b> (604-618) SEQ ID NO: 79	3 - 35 ng/ml		Potencjalny serologiczny marker gruźlicy (De Grootte i in., 2017).
<b>Syntetaza tryptofanylo-tRNA, cytoplazmatyczna (WARS)</b> (Cytoplazmatyczna ligaza tryptofan-tRNA, Tryptophanyl-tRNA synthetase, TrpRS, Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic) [WARS, P23381] Długość: 471 aa, Masa (Da): 53165	<b>DLTLDQAYSVAVENAK</b> (205-220) SEQ ID NO: 80 <b>GIFGFTDSDCIGK</b> (265-277) SEQ ID NO: 81 <b>ISFPAIQAAPSFSNSFPQIFR</b> (278-298) SEQ ID NO: 82 <b>ALIEVLQPLIAEHQAR</b> (433-448) SEQ ID NO: 83	-		Potencjalny marker płynu parapneumonicznego (Z. Wang i in., 2012). Marker stanu zapalnego stosowany w praktyce klinicznej.
<b>Składowa C3 dopelniacza (C3)</b> (Complement C3) [C3, P01024] Długość: 1 663 aa, Masa (Da):	<b>SNLDEDI AEEENIVSR</b> (749-764) SEQ ID NO: 84 <b>VHQYFNVELIQGAVK</b> (1463-1478) SEQ ID NO: 85 <b>TFISPIK</b> (1583-1589) SEQ ID NO: 86	-		

187148	<p><b>Białko C-reaktywne (CRP)</b> (C-reactive protein) [CRP, P02741] Długość: 224 aa, Masa (Da): 25039</p>	<p><b>ESDTSYVSLK</b> (32-41) SEQ ID NO: 87 <b>GYSFYSYATK</b> (66-75) SEQ ID NO: 88 <b>QDNEILIFWSK</b> (77-87) SEQ ID NO: 89</p>	3 - 105 mg/l	<p>Potencjalny marker płynu infekcyjnego (J. M. Porcel i in., 2009). Serologiczny marker stanu zapalnego i infekcji stosowany w praktyce klinicznej (Sproston i Ashworth, 2018).</p>
<p><b>Białko S100A9 (S100A9)</b> (Protein S100-A9) [S100A9, P06702] Długość: 114 aa, masa (Da): 13242</p>	<p><b>NIETIINTFHQYSVK</b> (11-25) SEQ ID NO: 90 <b>LGHPTLNLNQGEFK</b> (26-38) SEQ ID NO: 91</p>	-	<p>Potencjalny marker płynu paraneuronicznego (Z. Wang i in., 2012).</p>	
<p><b>Osoczowe białko amyloidu P (APCS)</b> (Składnik P amyloidu w surowicy, Serum amyloid P-component) [APCS, P02743] Długość: 223 aa, Masa (Da): 25387</p>	<p><b>AYSLEFSYNTQGR</b> (65-76) SEQ ID NO: 92 <b>VGEYSLYIGR</b> (87-96) SEQ ID NO: 93 <b>QGYFVEAQPQK</b> (140-149) SEQ ID NO: 94</p>	-	<p>Potencjalny marker płynu infekcyjnego (Z. Wang i in., 2012).</p>	
<p><b>Wimentyna (VIM)</b> (Vimentin) [VIM, P08670] Długość: 466 aa, Masa (Da): 53652</p>	<p><b>ILLAELEQLK</b> (130-139) SEQ ID NO: 95 <b>FADLSEAAANR</b> (295-304) SEQ ID NO: 96 <b>ISLPLPNFSSLNLR</b> (411-424) SEQ ID NO: 97</p>	-	<p>Potencjalny marker płynu infekcyjnego (Domanski i in., 2016). Marker nowotworowy stosowany w patologii (Anatomic Pathology Lab Instruments by Roche Tissue Diagnostics, n.d.).</p>	

<p><b>Dehydrogenaza mleczanowa A (LDHA)</b> (Łańcuch A dehydrogenazy L-mleczanowej, L-lactate dehydrogenase A chain) [LDHA, P00338] Długość: 332 aa, Masa (Da): 36689</p>	<p><b>DYNTVANSK</b> (82-90) SEQ ID NO: 98 <b>FIPNVVK</b> (119-126) SEQ ID NO: 99 <b>LLIVSNPVDILTYVAWK</b> (133-149) SEQ ID NO: 100 <b>VTLTSEEAR</b> (306-315) SEQ ID NO: 101 <b>SADTLWGIQK</b> (319-328) SEQ ID NO: 102</p>	-	<p>Stosowany w praktyce klinicznej do klasyfikacji wysiękowego i przesiękowego płynu opłucnowego w oparciu o kryteria Light'a (Feller-Kopman i Light, 2018; José M. Porcel i Light, 2006). Serologiczny marker stanu zapalnego stosowany w praktyce klinicznej (Erez i in., 2014).</p>
<p><b>Dehydrogenaza mleczanowa B (LDHB)</b> (Łańcuch B dehydrogenazy L-mleczanowej, L-lactate dehydrogenase B chain) [LDHB, P07195] Długość: 334 aa, Masa (Da): 36638</p>	<p><b>LIAPVAEEEEATVPNNK</b> (8-23) SEQ ID NO: 103 <b>SLADELALVDVLEDK</b> (44-58) SEQ ID NO: 104 <b>IVVVTAGVR</b> (92-100) SEQ ID NO: 105 <b>GLTSVINQK</b> (300-308) SEQ ID NO: 106 <b>SADTLWDIQK</b> (320-329) SEQ ID NO: 107 <b>VIGSGCNLDSAR</b> (Dla "LDH" wspólny dla LDH A, B, i C: 158/159-169/170) SEQ ID NO: 108</p>	-	<p>Stosowany w praktyce klinicznej do klasyfikacji wysiękowego i przesiękowego płynu opłucnowego w oparciu o kryteria Light'a (Feller-Kopman i Light, 2018; José M. Porcel i Light, 2006). Serologiczny marker stanu zapalnego stosowany w praktyce klinicznej (Erez i in., 2014).</p>

Wynalazek został przedstawiony na rysunku, na którym:

Figura 1 przedstawia białka istotnie podwyższone w płynach nowotworowych. Względne ilości białka w próbkach płynów opłucnowych pochodzących od 209 pacjentów. Istotność statystyczna (wartość  $p$  w teście U Manna-Whitneya (MWU)) jest przedstawiona dla porównania płynów nowotworowych (RAK) z płynami gruźliczymi (PG), „innymi płynami infekcyjnymi” (IPI), „wszystkimi płynami infekcyjnymi” (WPI: łącznie płyny gruźlicze i „inne płyny infekcyjne”) lub płynami związanymi z niewydolnością narządów (PŁ: „płyny łagodne”) (czarne linie) oraz w porównaniu ze wszystkimi innymi płynami opłucnowymi łącznie (wartość  $p$  pokazana między „WPI” i „PŁ”). Wyniki nieistotne statystycznie ( $p > 0,05$ ) są oznaczone jako N.I. Pozostałe wyniki testu MWU można znaleźć w tabeli na fig. 4. Wykresy pudełkowe przedstawiają medianę i przedział międzykwartyłowy Q3-Q1.

Figura 2 przedstawia białka istotnie podwyższone w płynach gruźliczych i infekcyjnych. Względne ilości białka w próbkach płynów opłucnowych pochodzących od 209 pacjentów. Istotność statystyczna (wartość  $p$  testu U Manna-Whitneya (MWU)) jest przedstawiona nad wykresami w celu porównania płynów gruźliczych (PG), „innych płynów infekcyjnych” (IPI) lub „wszystkich płynów infekcyjnych” (łącznie płyny gruźlicze i „inne płyny infekcyjne”: WPI) w porównaniu z płynami nowotworowymi (RAK), „innymi płynami infekcyjnymi” lub płynami związanymi z niewydolnością narządów (PŁ: „płyny łagodne”) (wartość powyżej każdej grupy). Poniżej wykresów podano wartości  $p$  dla porównania płynów gruźliczych, „innych płynów infekcyjnych” lub „wszystkich płynów infekcyjnych” z wszystkimi innymi płynami opłucnowymi łącznie. Wyniki nieistotne statystycznie ( $p > 0,05$ ) są oznaczone jako N.I. Pozostałe wyniki testu MWU można znaleźć w tabeli na fig. 4. Wykresy pudełkowe przedstawiają medianę i przedział międzykwartyłowy Q3-Q1.

Figura 3 przedstawia wydajność klasyfikatora w rozróżnianiu płynów opłucnowych na pięć klas etiologicznych. (a) Krzywe ROC przedstawiające skuteczność diagnostyczną klasyfikatora rozróżniającego płyny opłucnowe do jednej z pięciu klas etiologicznych. Średnia wartość AUC (linia) jest przedstawiona z zacienionym  $\pm$  odchyleniem standardowym. Optymalny punkt odcięcia %-czułości/ %-swoistości jest sugerowany przez maksymalną wartość wskaźnika Youdena (linia pionowa: Max J-index). Dla każdej klasyfikacji wskazano 15 najbardziej istotnych cech (pomiarów poszczególnych peptydów białkowych lub średnie geometryczne z pomiarów wielu peptydów dla danego białka) stosowanych przez klasyfikator (wykres wstawkowy), ze wskazaniem, czy miały one wzrost (jasnoszary) lub spadek (ciemnoszary) w danej grupie płynów opłucnowych. (b)

Wykres przedstawiający średnie AUC klasyfikatora w funkcji liczby cech użytych łącznie dla czterech klasyfikacji płynów opłucnowych: nowotworowych, gruźliczych, „innych infekcyjnych” i „łagodnych”.

Figura 4 przedstawia w tabeli markery białkowe istotnie różniące się między pięcioma grupami płynów opłucnowych oraz ich potencjalną użyteczność diagnostyczną. Przedstawiono je w kolejności istotności dla wszystkich możliwych 26 porównań, na co wskazuje wartość AUC z analizy krzywej ROC. Przedstawiono wszystkie istotne różnice w ilościach markerów z wartością  $p \leq 0,05$  (test MWU), aby umożliwić porównanie większości markerów, a które działały najlepiej, wyróżniono (wartość  $p \leq 0,01$  test MWU (w kolorze szarym) i  $AUC: \geq 0,700$  (pogrubienie)).

Figura 5 przedstawia współczynniki korelacji liniowej Pearsona przedstawiające zgodność pomiędzy pomiarami ilościowymi peptydów wybranych dla danego białka w grupie 209 płynów opłucnowych, dla wszystkich białek celowanych kilkoma peptydami (przedstawione w tabeli 1). Wykres pudełkowy przedstawia medianę i przedział międzykwartyłowy Q3-Q1. Obserwacje odstające „outliers” zaznaczono jako kółka (wykraczające poza przedział  $Q1-1.5*IQR$  i  $Q3+1.5*IQR$ ) oraz obserwacje ekstremalnie odstające zaznaczono jako gwiazdki (wykraczające poza przedział  $Q1-3RQ$  i  $Q3+3RQ$ ). Do analizy użyto wszystkich danych i uzyskano medianę ze wszystkich współczynników korelacji liniowej Pearsona (wartość R) na poziomie  $0.926 \pm 0.124$  (mediana  $\pm$  odchylenie standardowe).

Figura 6 przedstawia białka z istotnie obniżonym poziomem ilościowym w płynach łagodnych. Względne poziomy białek w 209 płynach opłucnowych. Na wykresach przedstawiono wszystkie porównania istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ , test Manna-Whitneya) pomiędzy grupami płynów nowotworowych (RAK), płynów gruźliczych (PG) i płynów łagodnych (PŁ) względem płynów nowotworowych (RAK), płynów gruźliczych (PG), innych płynów infekcyjnych (IPI) oraz wszystkich płynów infekcyjnych (WPI), wartości podano powyżej każdej z grup. Poniżej wykresów zaprezentowano wszystkie istotne statystycznie wartości p dla porównań indywidualnych pięciu grup płynów opłucnowych względem pozostałych płynów. Wykresy pudełkowe przedstawiają medianę i przedział międzykwartyłowy Q3-Q1.

Figura 7 przedstawia białka z istotnie podwyższonym poziomem ilościowym w płynach nowotworowych o mniejszej zdolności do rozróżniania płynów (a), oraz białka o braku zdolności do rozróżniania płynów (brak istotności statystycznej) (b). Względne poziomy białek w 209 płynach opłucnowych. Wszystkie porównania istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ , test Manna-Whitneya) pomiędzy indywidualnymi grupami płynów zostały

przedstawione za pomocą klamer, a poniżej wykresów zaprezentowano wszystkie istotne statystycznie wartości p dla porównań indywidualnych pięciu grup płynów względem pozostałych płynów. Wykresy pudełkowe przedstawiają medianę i przedział międzykwartyłowy Q3-Q1.

Figura 8 przedstawia wykresy pokazujące wartość predykcyjną dodatnią (PPV) vs. czułość dla każdej z pięciu grup płynów opłucnowych. Zaprezentowane jako średnia wartość PPV (czarna linia)  $\pm$  odchylenie standardowe (ciemnoszare pole).

Figura 9 przedstawia w formie tabeli testowane białka z panelu 53 białek, które nie zostały wykryte w próbkach płynów opłucnowych. Panel pięćdziesięciu trzech białek składał się z markerów stosowanych w praktyce klinicznej oraz potencjalnych markerów opublikowanych w literaturze naukowej, które wykazały wysoki potencjał w diagnostyce lub klasyfikacji płynów opłucnowych, diagnostyce nowotworów lub chorób infekcyjnych w próbkach osocza/surowicy krwi z zastosowaniem testów biochemicznych lub opartych na reakcji z przeciwciałami (immunotestów), stosowanych w praktyce klinicznej, lub indywidualnych i multipleksowych testów z zastosowaniem technik takich jak globalna i celowana proteomika oparta na spektrometrii mas lub z zastosowaniem przeciwciał. Dwadzieścia dziewięć białek (ADA1 i ADA2 (reprezentujące ADA), C3, C9, CEA/CEACAM5, CK-6, CK-7, CK-8, CK-14, CK-17, CK-18, CK-19, CRP, GRP, IFNG, LDHA, LDHB, and LDHC (reprezentujące LDH), MSLN, MUC-1/CA 15-3, MUC-16/CA-125, NSE, CDH1, MMP9, EPCAM, VIM, WFDC2/HE4, SPB3/SCCA-1 and SPB4/SCCA-2 (reprezentujące SCCA)) reprezentuje testy stosowane w praktyce klinicznej. Trzydzieści dwa, trzynaście i osiem białek to zatwierdzone lub potencjalne markery odpowiednio nowotworów, gruźlicy i infekcji/stanu zapalnego.

### **Przykłady**

#### **Materiały i metody:**

##### **1) Próbki kliniczne płynów opłucnowych**

Próbki płynów pobrano podczas standardowego zabiegu torakopunkcji i sklasyfikowano w Mazowieckim Centrum Leczenia Chorób Płuc i Gruźlicy (MCLChPiG). Badanie uzyskało aprobatę Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Warszawie (KB/928/14) oraz Komisji Bioetycznej przy Narodowym Instytucie Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie (nr. KBT-5/1/2019) oraz wszystkie badania przeprowadzono zgodnie z odpowiednimi wytycznymi i przepisami. Od każdego pacjenta uzyskano pisemną świadomą zgodę. Próbki zostały zidentyfikowane i zakodowane do analiz proteomicznych i były traktowane zgodnie z praktykami na poziomie II bezpieczeństwa biologicznego. Trzysta sześćdziesiąt siedem próbek płynów, od

poszczególnych pacjentów, pobrano prospektywnie przez okres 5,7 lat i przetworzono jak opisano wcześniej (Domanski i in., 2016), z supernatantami przechowywanymi w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu analizy. Starano się zebrać większość płynów dostępnych w MCLChPiG, aby uzyskać rzeczywistą reprezentację częstości występowania różnych typów płynów opłucnowych spotykanych w takim pojedynczym ośrodku klinicznym. Wysięki klasyfikowano jako przesiękowe lub wysiękowe zgodnie z kryteriami Lighta. Rozpoznanie wysięku złośliwego lub związanego z nowotworem opierało się na wykazaniu komórek nowotworowych w badaniu cytologicznym zassanego płynu lub badaniu histopatologicznym materiału z biopsji opłucnej, uzyskanego za pomocą wideotorakoskopii, wykonanego przez dwóch doświadczonych patologów. Gruźlicze zapalenie opłucnej rozpoznano na podstawie potwierdzenia *Mycobacterium tuberculosis* w płynie opłucnowym, płwocinie lub popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych, lub jeśli w biopsji opłucnej pobranej podczas wideotorakoskopii stwierdzono gruźlicę. Do diagnozowania innych chorób zastosowano powszechnie przyjęte kryteria kliniczne. Z analizy wykluczono sto pięćdziesiąt osiem płynów opłucnowych (65 płynów z rozpoznaniem ropniaka, 55 płynów o nieznannej etiologii, 8 płynów o dwóch lub więcej etiologiach i 30 łagodnych płynów jako nieokreślone płyny opłucnowe z przesiękiem – nienowotworowe i niezakaźne). Do analizy pobrano dwieście dziewięć płynów ze zdiagnozowaną etiologią. Zestawienie próbek i dane pacjenta przedstawiono w tabeli na fig. 4. Sto dziewięć płynów pochodziło od pacjentów ze zdiagnozowaną postacią raka (płyny związane z nowotworem) i obejmowało 82 ze zdiagnozowanym rakiem płuca (65 ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca (NSCLC) (NSCLC: z 33 podtypami ADC i 22 SCC) oraz 17 typów SCLC) oraz 27 ze zdiagnozowanym nowotworem wtórnym (dziesięć zdiagnozowanych jako rak sutka, cztery zdiagnozowane jako międzybłoniak opłucnej, cztery zdiagnozowane rak jajnika i jeden zdiagnozowany jako: czerniak złośliwy, chłoniak, białaczka, rak neuroendokryny, rak nerki, rak macicy, rak pęcherza moczowego, rak prostaty i nieznaną lokalizacją pierwotną). Dodatkowo wyniki cytologii uzyskano w 23,6 % tych przypadków. Pięćdziesiąt osiem płynów pochodziło od pacjentów z chorobami zakaźnymi (wszystkie płyny infekcyjne) i obejmowało 25 płynów parapneumonicznych, 24 płynów gruźliczych, 6 płynów zapalnych i 3 płyny ropniakowe (nie ropne, tj. brak wizualnej manifestacji ropy). Czterdzieści dwa płyny pochodziły od pacjentów z dolegliwościami nienowotworowymi i nieinfekcyjnymi („płyny łagodne”) i obejmowały 27 płynów w wyniku niewydolności serca, cztery przesięki, pięć płynów w wyniku niewydolności nerek, 2 płyny w wyniku zapalenia stawów, oraz po jednym z

każdego płynu związanego z: zapaleniem trzustki, marskością wątroby, zatorowością płucną i pourazowego.

## **2) Opracowanie, optymalizacja i analiza testu MRM**

Selekcję peptydów proteotypowych do analizy MRM każdego białka docelowego i optymalizację ustawień MRM specyficznych dla peptydów i fragmentów przy użyciu wzorca wewnętrznego peptydów znakowanego stabilnym izotopem (SIS) przeprowadzono jak opisano wcześniej (Domanski i in., 2016). Wyboru peptydów dokonano ręcznie i za pomocą oprogramowania PeptidePicker, stosując wcześniej opisane kryteria (Mohammed i in., 2014).

Wybrane peptydy proteotypowe spełniały następujące warunki: unikalność sekwencji w proteomie człowieka; liczne obserwacje w bibliotekach spektralnych; długość nieprzekraczająca 21 reszt aminokwasowych oraz, jeśli to możliwe, niezawierające aminokwasów łatwo ulegających modyfikacji chemicznej (np. Cys, Met) lub sekwencji podatnych na modyfikacje (np. DP, DG). Peptydy wykluczono, gdy miały niską wydajność trawienia, wysoką częstotliwość polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), znane modyfikacje potranslacyjne (PTM) lub cechy biologiczne wpływające na dokładność ich pomiaru.

Wybrane peptydy zsyntetyzowano jako peptydy SIS przy użyciu znakowanych izotopowo aminokwasów na końcu C:  $^{13}\text{C}_6$ -,  $^{15}\text{N}_4$ -Arg lub  $^{13}\text{C}_6$ -,  $^{15}\text{N}_2$ -Lys (98 % wzbogacenie izotopowe) przez JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Niemcy) jako SpikeTides\_L. Analizę MRM przeprowadzono na potrójnym kwadrupolu (TQ) MS od Waters Xevo (Waters, Milford, MA) sprzężonym z UPLC Waters nanoAcquity przez źródło Zspray Nanoflow z emiterym 10  $\mu\text{m}$  SilicaTip PicoTip (New Objective, MA, USA) i kolumną analityczną Waters nanoAcquity UPLC BEH130 C18 (75  $\mu\text{m}$  x 150 mm, wielkość cząstek 1,7  $\mu\text{m}$ ) w 40 °C oraz kolumną pułapkową Waters Symmetry 100 C18 (180  $\mu\text{m}$  x 20 mm, wielkość cząstek 5  $\mu\text{m}$ ). Wszystkie rozpuszczalniki i modyfikatory były klasy do LC-MS. Faza ruchoma A zawierała 0,1 % kwasu mrówkowego (Sigma-Aldrich) w wodzie (J.T.Baker, Holandia). Peptydy wprowadzono na kolumnę-pułapkę z szybkością 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  i rozdzielono przy 350  $\text{nl}/\text{min}$  przy użyciu 60-minutowego przebiegu LC z gradientem acetonitrylu (JTBaker) z 0,1 % kwasem mrówkowym (faza ruchoma B) zmieniającym się od 1 % do 10 % od 0 do 10 minut i od 10 % do 45 % od 10 do 40 minut, po czym następuje przemycie 90 % B i równoważenie. Parametry MS obejmowały napięcie kapilarne 3,5 kV, przepływ gazu oczyszczającego 100 l/h, przepływ gazu stożkowego 5 l/h, gaz NanoFlow ustawiony na 50 kPa (0,5 bara) i temperaturę źródła 150 °C. Wstępne metody analityczne były ukierunkowane na 53 białka poprzez

skanowanie w poszukiwaniu 205 endogennych peptydów i 205 komplementarnych peptydów SIS, przy użyciu zoptymalizowanych parametrów LC-MRM. W celu zwiększenia specyficzności, każdy z peptydów endogennych i SIS monitorowano za pomocą pięciu jonów fragmentacyjnych (łącznie 2050 przejść). Ostateczna metoda została zredukowana do głównie wykrywalnych białek i ukierunkowana na 34 markery z 105 peptydami i SIS każdy w dwóch 60-minutowych analizach LC-MRM na próbkę (818 przejść). Poziom markera w próbce płynu opłucnowego podaje się jako względną ilość białka na objętość płynu opłucnowego. Wynika to ze zmierzonej względnej ilości jednego lub większej liczby peptydów (średnia geometryczna) na białko, znormalizowanej względem odpowiedniego peptydu(-ów) SIS. Ilość peptydu endogenego podaje się jako stosunek powierzchni pików, będący sumą powierzchni pod pikami wszystkich przejść dla peptydu endogenego podzieloną przez sumę powierzchni pików przejść jego ciężkiego standardu. Aby umożliwić normalizację danych intensywności między próbkami pod względem fluktuacji sygnału MS i różnic w przetwarzaniu próbek po trawieniu, do wszystkich próbek dodano równoważne ilości peptydów SIS. Przeprowadzono ręczną kontrolę sygnałów dla każdej próbki, aby zapewnić prawidłowe wykrywanie pików, dokładną integrację i przejścia wolne od zakłóceń. Metody MRM i analizy danych przeprowadzono w Skyline-Daily Ver. 21 (oprogramowanie laboratoryjne MacCossa).

### **3) Trawienie próbki płynu opłucnowego**

Praca z próbkami płynu opłucnowego przed trawieniem trypsyną była przeprowadzana w komorze laminarnej z filtrem HEPA i przy użyciu końcówek filtrujących i ultraczystych odczynników (Sigma-Aldrich). Przygotowanie próbek i analizy MRM były randomizowane. Po rozmrożeniu płynu opłucnowego wirowano przy  $15000 \times g$  przez 5 min w  $4^\circ C$ . Płyn opłucnowy analizowano z uwzględnieniem objętości, biorąc do analizy 2,5  $\mu l$  każdej próbki. Próbki denaturowano przez dodanie 97,5  $\mu l$  8,4 M mocznika w 50 mM buforze Trizma/chlorowodorek (pH 8,4, bufor Tris). Następnie zredukowano je 2  $\mu l$  50 mM chlorowodoru tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP) w 50 mM buforze Tris przez 30 min w  $37^\circ C$ , a następnie alkilowano 2  $\mu l$  777 mM jodoacetamidu w 50 mM buforze Tris przez 30 min w  $22^\circ C$ . Próbki inkubowano w wysokim stężeniu mocznika (7,88 M) w  $37^\circ C$  przez 4 godziny. Następnie dodano 741  $\mu l$  50 mM buforu Tris w celu obniżenia stężenia mocznika do 0,969 M, a białka strawiono 4  $\mu g$  (5  $\mu l$ ) zmodyfikowanej trypsyny o jakości do sekwencjonowania (Promega nr kat. V5111, Fitchburg, WI) w  $37^\circ C$  przez 16 godzin. Próbki następnie inkubowano w  $60^\circ C$  przez 30 min, schłodzono do  $37^\circ C$  i po raz drugi dodano 4  $\mu g$  (5  $\mu l$ ) zmodyfikowanej trypsyny, po czym inkubowano przez 2 godziny w  $37^\circ C$ . Dodano mieszaninę peptydów SIS, aby uzyskać ilość

poszczególnych SIS w zakresie od 62,5 do 625 fmol/ $\mu$ g strawionej substancji, i próbki zakwaszono 0,1 % kwasem mrówkowym (KM) do końcowej objętości 1,0 ml. Peptydy odsolono przy użyciu wkładów Oasis HLB 1 ml (10 mg) (Waters), które zostały przepłukane 1 ml metanolu o czystości do LC-MS i 1 ml wody o czystości do LC-MS. Próbkę wprowadzono i przemyto 1 ml wody, a następnie eluowano w 200  $\mu$ l 65 % acetonitrylu o czystości LC-MS, 0,1 % kwasem mrówkowym. Eluowane próbki suszono za pomocą SpeedVac (Labconco) i ponownie zawieszano w 95  $\mu$ l 0,1 % kwasu mrówkowego, poddawano działaniu ultradźwięków przez 5 min i wirowano przy  $14000 \times g$  przez 3 min. Do analizy nano-LC-MS-MRM wstrzyknięto 3,8  $\mu$ l próbki. Pomiędzy każdą próbką wykonywano dwie ślepe próbki (0,1 % KM), a próbkę QC regularnie analizowano w celu monitorowania wydajności systemu LC-MS.

**4) Analiza statystyczna:** Dane zostały przetworzone przy użyciu SPSS Statistics (wersja 27.0; IBM Corp., Armonk, NY). Dla porównań poziomu białka wykonano nieparametryczny test U Manna-Whitney'a (MWU). Krzywe charakterystyki operacyjnej odbiornika (ROC) dla porównań parami przeprowadzono w programie SPSS, a pole pod krzywą (AUC) podano w celu wskazania potencjału diagnostycznego. Klasyfikacji dokonano w ramach programu Scikit-learn w wersji 0.24.2 (Pedregosa i in., 2012). Klasyfikatory zostały zbudowane przy użyciu biblioteki XGBoost w wersji 1.2.0 (T. Chen i Guestrin, 2016). Wydajność klasyfikatora oszacowano przy użyciu 10-krotnej warstwowej walidacji krzyżowej z dostrajaniem hiperparametrów w zagnieżdżonej 5-krotnej walidacji krzyżowej. Dostrojone hiper-parametry to: 'learning\_rate', 'max\_depth', 'min\_child\_weight', 'subsample', 'colsample\_bytree', and 'n\_estimators', z przeprowadzonym pełnym przeszukiwaniem siatki. Procedurę walidacji krzyżowej powtórzono 10 razy z różnymi losowymi wartościami ziarna 'seed'. Wstępne przetwarzanie danych przeprowadzono w pętli walidacji krzyżowej i obejmowało funkcje skalowania do zerowej średniej i jednostkowego odchylenia standardowego w zbiorze uczącym oraz imputację brakujących wartości. Zastosowano metodę imputacji k-najbliższych sąsiadów, przy domyślnym ustawieniu  $k=5$ . Rekurencyjna eliminacja cech została wykorzystana do oszacowania optymalnej liczby cech potrzebnych do klasyfikacji. W tym eksperymencie zmniejszono rozmiar siatki hiperparametrowej z powodu wysokich kosztów obliczeniowych. W celu uzyskania listy najważniejszych cech dla każdej grupy osobny model wykonujący jeden-kontra-reszta klasyfikacji binarnej został wytrenowany. Dla porównania przeprowadzono walidację pojedynczego podziału ze stratyfikowanym (proporcje grup płynu opłucnowego są takie same) losowym podziałem danych na zestawy 70 %/30 % trening/test.

## Wyniki

**1) Wybór białek i opracowanie panelu do testu MRM:** Przygotowano do badań panel pięćdziesięciu trzech białek (**tabela 1 i fig. 9**) obejmujący biomarkery stosowane w praktyce klinicznej oraz opublikowane w literaturze naukowej o potencjale diagnostycznym do określania etiologii płynów opłucnowych, wykrywania nowotworów lub chorób infekcyjnych w badaniach osocza krwi. Dwadzieścia dziewięć białek reprezentuje markery stosowane w praktyce klinicznej. Trzydzieści dwa, trzynaście i osiem białek to odpowiednio potencjalne lub powszechnie stosowane markery nowotworowe, gruźlicze i infekcji/stanu zapalnego. Następnie dla wybranych 53 białek zbudowano specyficzne metody MRM.

Dla każdego z markerów, do ilościowej analizy celowanej wybrano od jednego do siedmiu peptydów tryptycznych odznaczających się dużą liczbą obserwacji podczas eksperymentów, odnotowanych w proteomicznych bazach danych, posiadających unikalną sekwencję dla danego białka w ludzkim proteomie oraz niezawierających modyfikowalnych aminokwasów (aby uniknąć potencjalnych modyfikacji post-translacyjnych lub polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, które pogarszają dokładność analizy ilościowej), dając łącznie 205 celowanych peptydów. Dla każdego z celowanych peptydów zsyntetyzowano jego odpowiednik ze znakowaną trwałym ciężkim izotopem resztą lizyny lub argininy, pełniący rolę wzorca wewnętrznego (SIS), w celu zwiększenia specyficzności, precyzji i czułości testu. Te syntetyczne standardy wewnętrzne zastosowano także do empirycznej optymalizacji metod MRM składających się ze specyficznych dla peptydów, zoptymalizowanych metod skanowania MS, celujących w precyzyjnie wybrane peptydy reporterowe i ich jony fragmentacyjne, aby umożliwić ilościowe oznaczanie analitów z wysoką specyficznością i precyzją (Domanski i in., 2016). Dodatkowo, w celu zwiększenia specyficzności i precyzji testu, 98 % i 89 % markerów białkowych analizowano za pomocą odpowiednio dwóch lub większej liczby i trzech lub większej liczby celowanych peptydów.

Dodanie równych ilości syntetycznych standardów wewnętrznych (SIS) do wszystkich próbek płynów opłucnowych pozwoliło na normalizację otrzymanych wyników oraz eliminację efektów związanych z preparatyką próbek po etapie trawienia i przebiegiem analiz LC-MS. Względny pomiar ilościowy peptydów w płynach opłucnowych dokonano z zastosowaniem normalizacji do syntetycznych standardów wewnętrznych. Na podstawie względnych pomiarów ilościowych peptydów celowanych dla danego białka wyznaczono średnią wartość dla danego białka, reprezentującą jego

poziom w próbkach płynu. Wyniki analizy ilościowej przedstawiono jako względny poziom markerów na stałą objętość płynu opłucnowego.

Protokół przygotowania próbek do analizy oraz trawienia białek został zoptymalizowany, tak aby zapewnić możliwie najwyższą czułość testu dla markerów analizowanych w panelu oraz aby zapewnić, możliwie najwyższą (z technicznego punktu widzenia) efektywność trawienia białek. Ze względu na zróżnicowanie w poziomie całkowitego stężenia białek w płynach opłucnowych i potencjalnym wpływie tego zjawiska na etap trawienia białek trypsyną, która dostarcza zastępczych peptydów reporterowych, opracowano specyficzną dla płynów opłucnowych i prostą procedurę trawienia białek w roztworze, jak opisano w punkcie powyżej pt. „Trawienie próbki płynu opłucnowego”. Jednak każda procedura trawienia prowadząca do uzyskania wskazanych peptydów może być zastosowana. Ogólnie, składa się ona z: 4-godzinnego etapu denaturacji białek w moczniku o wysokim stężeniu oraz inkubacji w wysokiej temperaturze, po której następowało drugie trawienie białek w trypsynie, dodawanej w dużym nadmiarze, aby zapewnić maksymalną denaturację oraz możliwie najwyższą efektywność trawienia białek, co jest szczególnie istotne w przypadku białek wykazujących dużą oporność proteolityczną. Optymalizacja procedury trawienia białek zwiększyła także czułość testu. Dodatkowo, w celu nadzorowania przebiegu trawienia białek, we wszystkich próbkach płynów opłucnowych, monitorowano poziom dwóch głównych białek osocza, albuminy surowicy i transferryny, aby wykryć potencjalne problemy na etapie trawienia białek. Aby ustalić możliwości detekcji 53 białek z panelu, za pomocą standardowego instrumentu TQ LC-MS (ang. Triple Quadrupole Liquid Chromatography–Mass Spectrometry), przeprowadzono wstępną analizę MRM na „próbkach łączonych”, składających się z kilku płynów o tej samej etiologii oraz na indywidualnych próbkach płynów, obejmujących najczęściej występujące etiologie płynów opłucnowych: gruczolakorak płuca (ADC), rak płaskonabłonkowy płuca (SCC), niedrobnokomórkowy (NSCLC) i drobnokomórkowy rak płuca (SCLC), międzybłoniak opłucnej, nowotwór sutka, gruczlica opłucnej, zapalenie płuc i niewydolność serca.

Na podstawie tych wyników do ostatecznego panelu zakwalifikowano 34 biomarkery możliwe do detekcji za pomocą standardowego instrumentu TQ LC-MS oraz będące białkami istotnymi dla klasyfikacji płynów opłucnowych, celowanych 105 peptydami (i odpowiadających im syntetycznych standardów wewnętrznych) do analizy ilościowej. W ostatecznym panelu, aż 91 % markerów białkowych było celowanych za pomocą dwóch lub więcej peptydów. Następnie przeprowadzono analizę MRM 209

próbek płynów opłucnowych pochodzących od pacjentów po torakocentezie z zastosowaniem opracowanego panelu, podczas której wykryto 29 celowanych białek.

Poziomy wielu peptydów, celowanych dla pojedynczego białka, w całym zestawie analizowanych próbek, wykazały medianę współczynnika korelacji Pearsona (wartość R)  $0,926 \pm SD 0,124$ , z rozkładem pokazanym na **fig. 5**, wskazującym na wysoką zgodność między wieloma peptydami celowanymi dla danego białka, ze zwiększoną zmiennością związaną z mniejszą abundancją markera. Peptydy z ogólnie bardzo niskimi sygnałami zostały pominięte w końcowej analizie danych, a te które zostały zastosowane, przedstawiono w **tabeli 1**.

**2) Analiza MRM 209 próbek płynów opłucnowych od pacjentów i różnice w poziomach markerów białkowych w pięciu grupach płynów opłucnowych oraz zdolności indywidualnych markerów do rozróżniania etiologii płynów:** Do celów analizy statystycznej 209 próbek płynu opłucnowego podzielono na 5 grup: płyny nowotworowe (n=109), „wszystkie płyny infekcyjne” (gruźlica i inne choroby infekcyjne płuc/opłucnej, n=58), płyny spowodowane niewydolnością narządów (innych niż płuca), stanowiące głównie przezięki („płyny łagodne”, n=42), z dalszym podziałem płynów infekcyjnych na płyny gruźlicze (n=24) i „inne płyny infekcyjne” spowodowane chorobami infekcyjnymi płuc i opłucnej (n=34). W tabeli na fig. 4 przedstawiono białka, których poziom w płynach różnił się w sposób istotny statystycznie ( $p \leq 0,05$ ; na podstawie testu Manna-Whitney’a (MWU)) pomiędzy 5 grupami płynów oraz prezentuje ich potencjalną użyteczność diagnostyczną na podstawie wartości AUC (pole powierzchni pod krzywą) otrzymanych z analiz krzywych ROC. Tabela obejmuje wszystkie możliwe porównania pomiędzy grupami, dając łącznie 26 porównań, a w obrębie danego porównania białka są przedstawione w kolejności od najwyższej istotności statystycznej do wartości  $p \leq 0,05$ , aby zaprezentować porównanie większości markerów. Podkreślono także białka, które uzyskały najlepsze wyniki ( $p \leq 0,01$  test MWU i  $AUC \geq 0,700$ ).

Analiza ilościowa markerów białkowych w próbkach płynu opłucnowego była przeprowadzona na daną (stałą) objętość płynu, co jest powszechnie stosowane w laboratoriach diagnostycznych w analizach płynu opłucnowego i innych ludzkich płynach biologicznych. Odbywa się to pomimo znanej zmienności całkowitego stężenia białka wśród płynów opłucnowych, która w opisanym tu przypadku kształtowała się następująco: wszystkie płyny:  $41,2 \text{ g/l} \pm 9,31 \text{ SD}$ , płyny nowotworowe:  $41,4 \text{ g/l} \pm 7,64 \text{ SD}$ , płyny gruźlicze:  $47,2 \text{ g/l} \pm 6,64 \text{ SD}$ , „inne płyny infekcyjne”  $47,8 \text{ g/l} \pm 5,36 \text{ SD}$  i płyny związane z niewydolnością narządów:  $28,3 \text{ g/l} \pm 9,26 \text{ SD}$ .

W grupie płynów nowotworowych zaobserwowano istotnie podwyższone poziomy sześciu białek, które biorą udział w adhezji komórek i rozwoju nowotworu: kadheryna-1 (CDH1), trombospondyna-4 (THBS4), mezotelina (MSLN), mucyna-1 (MUC-1, CA 15-3), domena Sushi, czynnik von Willebranda typu A EGF i białko zawierające domenę pentraksyny 1 (SVEP1 - ang. sushi von Willebrand factor type A EGF and pentraxin domain-containing protein 1) oraz inhibitor proteazy typu Kunitz 1 (SPINT1) (**fig. 1**). Każdy z sześciu wyżej wymienionych markerów białkowych, pozwala na rozróżnienie płynów nowotworowych od „wszystkich płynów infekcyjnych”, płynów gruczliczych, „innych płynów infekcyjnych” i od wszystkich płynów nienowotworowych łącznie (n=100), z odnotowanymi wartościami AUC w zakresie 0,650 do 0,822. Do rozróżniania płynów nowotworowych od nienowotworowych, najlepszymi biomarkerami okazały się białka: CDH1, MUC1, THBS4 i MSLN (AUC: 0,766 do 0,698). Natomiast najlepszym markerem do rozróżniania płynów nowotworowych od każdej innej grupy płynów, było białko CDH1 (AUC: 0,734-0,822). Białka SVEP1, THBS4 i MSLN umożliwiły skuteczne rozróżnienie płynów nowotworowych od płynów gruczliczych, „innych płynów infekcyjnych” i „wszystkich płynów infekcyjnych” (AUC: 0,705-0,777), natomiast znacznie gorzej można było rozróżnić na podstawie poziomów tych trzech białek płyny nowotworowe od spowodowanych niewydolnością narządów („płyny łagodne”) (np. dla SVEP1 brak istotności statystycznej, a dla reszty niska istotność). Poziomy białek MUC-1 oraz CK-8 i CK-18, które są markerami nowotworowymi stosowanymi w praktyce klinicznej, były istotnie podwyższone w płynach nowotworowych i najlepiej sprawdziły się w rozróżnianiu płynów nowotworowych od płynów spowodowanych niewydolnością narządów (AUC w zakresie 0,699-0,747). Spośród trzech wyżej wymienionych białek, najlepszym biomarkerem okazał się być MUC1 i umożliwił rozróżnianie płynów nowotworowych od płynów gruczliczych, „innych płynów infekcyjnych”, „wszystkich płynów infekcyjnych” z odnotowanymi wartościami AUC w zakresie 0,671-0,673. Poziom białka SPINT1 był istotnie wyższy w płynach nowotworowych we wszystkich porównaniach pomiędzy grupami, ale jego zdolność do rozróżniania grup płynów była znacznie niższa. Podsumowując, w opracowanym teście opartym na spektrometrii mas, białko CDH1 jest najlepszym markerem nowotworowym, który skutecznie rozróżnia płyny nowotworowe od każdej innej grupy płynów. Dodatkowo, białka THBS4, MSLN i SVEP1, wspierają różnicowanie płynów nowotworowych od infekcyjnych, a MUC1 różnicuje płyny nowotworowe od wszystkich nienowotworowych.

W grupie płynów gruczliczych, zaobserwowano wysoki poziom trzech potencjalnych biomarkerów gruczliczych: deaminazy adenylozynowej (ADA2), chemokiny

CXCL10 (CXCL10) oraz cytoplazmatycznej syntetazy tryptofanylo-tRNA (WARS), charakterystyczny tylko dla tej grupy płynów (**fig. 2**). Były to jedyne markery, które pozwalały na rozróżnianie płynów gruzliczych od „innych płynów infekcyjnych” z wysoką istotnością statystyczną, z indywidualnymi wartościami AUC w zakresie 0,784 do 0,876. Ponadto, były one także najlepszymi markerami umożliwiającymi rozróżnienie płynów gruzliczych od wszystkich innych płynów łącznie (n=185) z wartościami AUC w zakresie 0,832-0,881 oraz były jednymi z najlepszych markerów umożliwiającymi rozróżnienie płynów gruzliczych od nowotworowych i powodowanych niewydolnością narządów (AUC: 0,828-0,906). Dodatkowo siedem białek, które były podwyższone w grupie płynów gruzliczych, pozwalały na ich rozróżnianie od płynów nowotworowych, powodowanych niewydolnością narządów i grupy wszystkich innych płynów łącznie, ale ich poziomy były także podwyższone w grupie „innych płynów infekcyjnych”. Wspomniane wyżej białka, stanowią przede wszystkim markery stanu zapalnego i są nimi: wimentyna (VIM), galektyna 1 (LGALS1), surowicze białko amyloidu P (APCS), białko S100A9 (S100A9), metaloproteinaza 9 (MMP9), dehydrogenaza mleczanowa A (LDHA) i białko C-reaktywne (CRP) (AUC: 0,674 do 0,867, najwyższa wartość AUC dla wimentyny). Powyższe siedem białek umożliwia rozróżnianie „innych płynów infekcyjnych” od nowotworowych, związanych z niewydolnością narządów i grupy wszystkich innych płynów łącznie, (AUC: 0,650-0,873), a najlepszym markerem we wszystkich trzech porównaniach było białko S100A9 (AUC: 0,773-0,873). Pomimo, że grupie „innych płynów infekcyjnych” nie przypisano żadnego markeru specyficznego podwyższonego tylko w tej grupie, to hemopeksyna (HPX), której poziom był wysoki także w płynach nowotworowych (**fig. 1**), była białkiem, które umożliwiało rozróżnienie „innych płynów infekcyjnych” od gruzliczych (AUC: 0,707). Również w grupie „wszystkich płynów infekcyjnych”, obejmującej płyny gruzlicze i „inne płyny infekcyjne”, zaobserwowano istotnie podwyższone poziomy wyżej wymienionych dziesięciu białek, które umożliwiają rozróżnienie „wszystkich płynów infekcyjnych” od płynów nowotworowych, związanych z niewydolnością narządów i grupy wszystkich innych płynów łącznie (AUC: 0,664-0,858). Podsumowując, płyny infekcyjne można skutecznie odróżnić od innych płynów, dzięki podwyższonemu poziomowi dziesięciu markerów białkowych. Podwyższone poziomy siedmiu z nich: S100A9, VIM, LGALS1, APCS, MMP9, LDHA i CRP, wskazują na „wysięk infekcyjny” o dalej niewyjaśnionej etiologii, przy czym białko S100A9 jest najlepszym markerem dla grupy „innych płynów infekcyjnych”. Dodatkowo płyny gruzlicze mogą być zidentyfikowane dzięki podwyższonemu poziomowi białek ADA2, CXCL10, WARS (AUC: 0,826-0,906), specyficznemu tylko dla tej grupy, a najlepszym z

markerów jest ADA2. Białko ADA występuje w dwóch izoformach, ADA1 oraz ADA2, których całkowita aktywność enzymatyczna jest mierzona w teście diagnostycznym w kierunku gruźlicy, natomiast w opisanych badaniach izoforma ADA1 nie została wykryta w żadnej z analizowanych próbek płynu opłucnowego.

Dodatkowo zaobserwowano podwyższony poziom markerów, wspólny dla czterech grup płynów opłucnowych (płynów nowotworowych, płynów gruźliczych, „innych płynów infekcyjnych” i „wszystkich płynów infekcyjnych”) i pozwalający na rozróżnienie ich od płynów spowodowanych niewydolnością narządów („płyny łagodne”), z odnotowanymi wartościami AUC sięgającymi 0,880 (**fig. 6**). Wspomniane powyżej markery obejmowały hemopeksynę (HPX), dehydrogenazę mleczanową B (LDHB), dehydrogenazę mleczanową (LDH: obejmującą LDH-A, -B i -C), składową C3 dopełniacza (C3), składową C9 dopełniacza (C9) i czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (SERPINF1). Połowa z tych białek, to białka osocza krwi, a ich podwyższony poziom w czterech grupach płynów opłucnowych, jest prawdopodobnie spowodowany tym, że większość płynów związanych z niewydolnością narządów, stanowią przesieki, które charakteryzują się niższym całkowitym stężeniem białek osocza. Podkreśla to także fakt, że poziomy wielu ze wspomnianych wcześniej, markerów specyficznych dla danej etiologii płynów (np. WARS) są wyższe w każdej z grup płynów, oprócz tych związanych z niewydolnością narządów. Jednak białko SVEP1, które umożliwia rozróżnianie płynów nowotworowych i infekcyjnych, okazało się być także jedynym markerem podwyższonym w płynach związanych z niewydolnością narządów („płyny łagodne”) i pozwalało na ich rozróżnianie od wszystkich trzech grup płynów infekcyjnych (AUC: 0,800-0,802). Pomimo, że dla grupy płynów związanych z niewydolnością narządów, nie zaobserwowano żadnego specyficznie podwyższonego markeru, to obniżony poziom wymienionych wcześniej sześciu białek i podwyższony poziom SVEP1, wykluczają nowotworową i infekcyjną etiologię płynu.

Inne markery, których poziomy były podwyższone, ale wykazały mniejszą zdolność do umożliwienia rozróżnienia grup płynów, mają potencjał aby zostać markerami chorobowymi, przy zastosowaniu w przyszłości bardziej czułych testów opartych na spektrometrii mas, np. antygen CD166 (ALCAM), cytokeratyna 19 (CK-19) i kalistatyna (SERPINA4) były podwyższone w płynach nowotworowych (**fig. 7**), ale odnotowane wartości AUC były niskie (0,580-0,584). Inne białka w teście według wynalazku nie wykazały dużej istotności w rozróżnianiu między badanymi grupami płynów opłucnowych. CK-6 i CK-7 wykryto w kilku płynach nowotworowych, ale ich poziomy nie różniły się z istotnością statystyczną. Gelsolin (GSN) wykryto uzyskując dobry sygnał

pochozący od czterech peptydów we wszystkich próbkach, ale nie różnicował żadnej z grup płynów opłucnowych.

**3) Zastosowanie klasyfikatora wieloklasowego do klasyfikacji płynów opłucnowych:** Uzyskane dane z eksperymentu przetestowano z zastosowaniem metodyki uczenia maszynowego typu „Boosted Trees”, w celu sprawdzenia jej możliwości do klasyfikacji płynów opłucnowych do jednej z czterech grup, odpowiadających etiologiom płynu: płyn nowotworowy, gruźliczy, „inny infekcyjny” i związany z niewydolnością narządów („płyn łagodny”) oraz ujawnienia najważniejszych cech (ang. top features) dla klasyfikacji. Dodatkowa piąta grupa „wszystkie płyny infekcyjne”, została sztucznie stworzona przez połączenie grupy płynów gruźliczych i „innych płynów infekcyjnych”. Przedstawiono dane dotyczące abudancji białka oraz poziomów indywidualnych peptydów, aby nie przegapić potencjalnie lepiej działającego markera, będącego pojedynczym peptydem. Metoda Boosted Trees opiera się na sekwencyjnym i progresywnym szkoleniu zestawu drzew decyzyjnych (ang. decision trees), w którym każde drzewo dodawane do zestawu jest konstruowane w celu poprawy jakości klasyfikacji w miejscu poprzednio błędnie sklasyfikowanych instancji (ang. misclassified instances). Potwierdza to, że wybrane przez klasyfikator najważniejsze cechy, mają potężną zdolność przewidywania. Zastosowano dziesięciokrotną walidację krzyżową (ang. cross-validation) ze stratyfikacją powtórzoną 10 razy, skutecznie testując 100 losowych podziałów i uśredniając uzyskane wyniki. Pozwoliło to określić zakres możliwości klasyfikacji i dostarczyło wartości odchylenia standardowego dla szacowanych parametrów. Ponadto, szczególną uwagę poświęcono, aby uniknąć nadmiernego dopasowania modelu (ang. overfitting), dostrajając hiperparametry w procedurze zagnieżdżonej walidacji krzyżowej (ang. nested cross-validation).

Klasyfikator przewidywał etiologię płynu opłucnowego, ze zdolnością do rozróżniania 5 grup płynów opłucnowych, określaną jako „bardzo dobrą” (Mandrekar, 2010), z odnotowanymi wartościami AUC w zakresie od 0,842 do 0,869 (**fig. 3a**). Aby zasugerować optymalny punkt odcięcia dla potencjalnego narzędzia diagnostycznego opartego na tym klasyfikatorze, podano maksymalną wartość wskaźnika Youdena „Max J-Index” oraz czułość i swoistość testu w tym punkcie. Przedstawiono również 15 najważniejszych cech wykorzystywanych dla każdej z klasyfikacji (**fig. 3a**). Zastosowanie wielu markerów do klasyfikacji płynów, wykazało poprawę zdolności do ich rozróżniania, wnioskując na podstawie odnotowanych wartości AUC, a zwłaszcza na podstawie wzrostu czułości testu przy jego 100 % swoistości (przy braku wyników fałszywie dodatnich: 0 FPR (ang. false positive rate)). Szczególnie skuteczne było przewidywanie nowotworowej

oraz gruźliczej etiologii płynu z czułością testu na poziomie odpowiednio 55 % i 67 % (i przy braku wyników fałszywie dodatnich). Klasyfikator odróżniał płyny nowotworowe od pozostałych płynów z wartością AUC wynoszącą  $0,863 \pm 0,074$  oraz czułością i swoistością na poziomie odpowiednio 71 % i 90 %. Najważniejszą cechą dla klasyfikacji płynów nowotworowych był poziom białka CDH1, a następnymi w kolejności pod względem ważności były podwyższone poziomy białek MUC1, THBS4, MSLN i HPX. Płyny gruźlicze zostały odróżnione od pozostałych płynów z wartością AUC na poziomie  $0,859 \pm 0,153$  oraz 75 % czułością i 94 % swoistością. Najważniejszymi cechami dla tej klasyfikacji były podwyższone poziomy białek ADA2, WARS i CXCL10 oraz ich indywidualnych peptydów. „Inne płyny infekcyjne” zostały odróżnione od pozostałych płynów z wartością AUC na poziomie  $0,863 \pm 0,096$  oraz 76 % czułością i 82 % swoistością. Wśród sześciu najważniejszych cech dla klasyfikacji „innych płynów infekcyjnych” znalazły się poziomy białek CRP i S100A9 oraz ich indywidualnych peptydów. Przetestowano również zdolność klasyfikatora do identyfikacji „wszystkich płynów infekcyjnych”, w rezultacie osiągając wartość AUC na poziomie  $0,869 \pm 0,086$  oraz 74 % czułość i 86 % swoistość. Najważniejszymi cechami dla tej klasyfikacji były podwyższone poziomy białek S100A9, VIM, WARS i ADA2. Klasyfikator wykazał również dobrą zdolność do rozróżniania płynów związanych z niewydolnością narządów („płyny łagodne”), które nie miały żadnych specyficznym podwyższonych markerów, z wartością AUC  $0,842 \pm 0,100$  oraz 77 % czułością i 77 % swoistością. Dwoma najważniejszymi cechami dla tej klasyfikacji były obniżone poziomy białek C9 i LDHA, a kolejno 10 dodatkowych cech obejmujących obniżone poziomy białek LDHA, C9, HPX, LDH i LDHB oraz ich indywidualnych peptydów. Procedury walidacji krzyżowej, takie jak ta zastosowana tutaj, są bardziej rygorystyczne przy szacowaniu wydajności klasyfikatorów, zwłaszcza gdy zbiór danych jest stosunkowo mały, niż klasyczne techniki walidacji z pojedynczym podziałem (Singh i in., 2021). Przeprowadzono tutaj jednak również podejście „treningu/testowania”, losowo dzieląc 209 płynów proporcjonalnie na trening/test 70 %/30 %. Wyniki AUC były bardzo zbliżone do tych z procedury walidacji krzyżowej, przy czym trzy przypadki były nawet wyższe: AUC-nowotworowe = 0,833, AUC-gruźlica = 0,924, AUC-inne-infekcyjne = 0,890 i AUC-łagodne = 0,851.

Ważną do rozważenia kwestią jest minimalna liczba markerów wymaganych w teście lub minimalna liczba testów z jednym markerem potrzebna do zachowania tej samej zdolności do rozróżniania etiologii. Zbadanie wpływu liczby wszystkich cech, wykorzystywanych przez klasyfikator dla wszystkich czterech grup, na uzyskane wartości AUC pokazuje, że użycie od 1 do 15 cech stopniowo zwiększa średnią wartość AUC z

0,645 do 0,862 (**fig. 3b**). Zwiększenie liczby cech powyżej 11 powoduje niewielki wzrost wartości AUC, z 0,853 do 0,867 przy 20 cechach. Wykorzystanie 15 cech wydaje się być rozsądnym wyborem, które wymagałoby pomiaru tylko 10 białek (CDH1, MUC1, THBS4, ADA2, WARS, CRP, S100A9, C9, LDHA i HPX) i jest czymś, co można łatwo osiągnąć podczas jednej 30-60 minutowej, multipleksowanej analizy LC-MS-MRM.

**4) Użyteczność diagnostyczna opracowanego testu opartego na zbudowanym klasyfikatorze:** Opracowany model może być stosowany do klasyfikacji płynów opłucnowych na podstawie danych ilościowych uzyskanych w analizie MRM panelu 29 białek, jako wspomagające narzędzie diagnostyczne, po przeprowadzeniu standardowych badań obrazowych i torakocentezie, w celu skrócenia czasu potrzebnego do diagnostyki etiologii płynów i wprowadzenia odpowiedniej terapii. Obliczono częstość występowania (prewalencję) pięciu etiologii płynów opłucnowych, testowanych przez klasyfikator, na podstawie całego zbioru zebranych próbek, stanowiącego 367 płynów pobranych od kohorty pacjentów (z tego samego szpitala), z wykluczeniem ropniaków, które są łatwe do zdiagnozowania, oraz z wykluczeniem płynów o nieznannej etiologii (tabela 2 poniżej). Znajomość prewalencji poszczególnych etiologii pozwoliła na obliczenie, istotnych z diagnostycznego punktu widzenia, dodatnich i ujemnych wartości predykcyjnych (odpowiednio PPV (ang. positive predictive value) i NPV (ang. negative predicitive value)), wskaźników wiarygodności dodatniego wyniku testu (ang. positive likelihood ratio, LR+) oraz ujemnego wyniku testu (ang. negative likelihood ratio, LR-), a także dokładności testu w wybranym punkcie odpowiadającym optymalnej wartości czułości oraz swoistości (Max J-index), dla każdej z pięciu klasyfikacji (tabela 2). Klasyfikator najlepiej odróżnia płyny nowotworowe i gruźlicze od pozostałych płynów, z dokładnością powyżej 80 %. Dokładność klasyfikacji „innych płynów infekcyjnych”, „wszystkich płynów infekcyjnych” i płynów związanych z niewydolnością narządów („płyny łagodne”), jest nieco niższa i wynosi od 76,8 do 79,9 %. Potwierdzają to również wartości wskaźników wiarygodności dodatniego wyniku testu - dla płynów gruźliczych LR+ wynosi 12,6, co oznacza, że uzyskanie dodatniego wyniku testu (zaklasyfikowanie do grupy płynów gruźliczych przez klasyfikator) znacznie zwiększa prawdopodobieństwo, z przed testu, występowania u pacjenta gruźlicy. W przypadku płynów nowotworowych, LR+ jest niższy niż dla gruźlicy i wynosi 7,07, co oznacza, na „umiarkowaną do dużej” poprawy w stosunku do prawdopodobieństwa przed testem zdiagnozowania występowania nowotworu u pacjenta przy uzyskaniu dodatniego wyniku testu. Natomiast, dla „innych płynów infekcyjnych”, „wszystkich infekcyjnych” oraz związanych z niewydolnością narządów, LR+ jest niższy, w zakresie 3,28-5,18, co wskazuje na „niskie do umiarkowanych”

zdolności testu do poprawy diagnostyki tych etiologii. Wskaźnik wiarygodności ujemnego wyniku testu (LR-) jest dla wszystkich grup płynów na podobnym poziomie (niewielkim do umiarkowanego), co oznacza, że ujemny wynik testu tylko nieznacznie poprawia zdolność obecnego rozwiązania do wykluczenia płynu z danej grupy. Wartości PPV/NPV wskazują, że dodatni wyniku testu na płyn nowotworowy daje 86% prawdopodobieństwa, że płyn naprawdę pochodzi od pacjenta z rakiem, natomiast ujemny wynik wiąże się z 78 % prawdopodobieństwem, że jest prawdziwy. Jeśli chodzi o płyny gruczlicze, to we względu na niższą prevalencję gruczlicy opłucnej, dodatni wynik testu z prawdopodobieństwem 58% prawidłowo identyfikuje płyn gruczliczy, natomiast ujemny wynik testu z prawdopodobieństwem 97 % prawidłowo wyklucza etiologie gruczlicy. Podobnie jest w przypadku „innych płynów infekcyjnych”, „wszystkich płynów infekcyjnych” oraz płynów związanych z niewydolnością narządów.

**Tabela 2.** Skuteczność diagnostyczna klasyfikatora z wartościami odcięcia czułości/swoistości wybranymi przy maksymalnym wskaźniku J (wskaźnika Youdena) z uwzględnieniem częstości występowania etiologii.

<b>Etiologia</b>	<b>Prewalen- cja ( %)</b>	<b>Czułość ( %)</b>	<b>Swoistość ( %)</b>	<b>PPV %</b>	<b>NPV %</b>	<b>LR+</b>	<b>LR-</b>	<b>Dokład- ność %</b>
Płyny nowotworowe	46,9	70,7	90,0	86,2	77,7	7,07	0,326	80,4
Płyny gruczlicze	9,8	74,5	94,1	57,8	97,1	12,6	0,271	84,3
Inne płyny infekcyjne	14,3	75,6	82,4	41,8	95,3	4,30	0,296	79,0
Wszystkie płyny infekcyjne	24,1	74,1	85,7	62,2	91,2	5,18	0,302	79,9
Płyny łagodne	29,0	77,1	76,5	57,3	89,1	3,28	0,299	76,8

Wybór optymalnych punktów odcięcia (przy danej czułości i swoistości testu), może różnić się w zależności od pytania diagnostycznego. W przypadku diagnostyki płynów opłucnowych, często są one wybierane tak, aby test charakteryzował się jak najwyższą swoistością (jak najniższy wskaźnik FPR), a tym samym umożliwił postawienie pewnej (jednoznacznej) diagnozy, kosztem uzyskania fałszywie ujemnych wyników testu dla części pacjentów. Przykładem jest badanie cytologiczne płynu opłucnowego mające na celu zdiagnozowanie nowotworu złośliwego u pacjentów ze 100 % specyficznością (0 FPR). W opracowanym przez nas klasyfikatorze przy wyborze punktu odcięcia odpowiadającego 100 % swoistości testu (0 FPR), czułość testu wynosi 55 %, 67 %, 40 %,

48 % i 29 % dla identyfikacji płynów opłucnowych związanych odpowiednio z nowotworem, gruźlicą, „inną chorobą infekcyjną płuc lub opłucnej”, „wszystkimi chorobami infekcyjnymi płuc i opłucnej” i niewydolnością narządów (innych niż płuca). Przedstawiono również krzywe PPV w funkcji czułości testu, dla każdej z pięciu klasyfikacji płynów, aby umożliwić wybór optymalnego punktu odcięcia, dopasowany do konkretnego pytania diagnostycznego (fig. 8). Krzywe tego typu wskazują jak wybrać optymalny punkt odcięcia, aby nie stracić wiele na czułości testu (czyli „nie przeoczyć” pacjentów z daną chorobą), jednocześnie uzyskując wysoki PPV dla bardziej precyzyjnej diagnozy, biorąc także pod uwagę częstość występowania danej choroby.

Wykazano, że ukierunkowane testy oparte na spektrometrii mas (LC-MS), w których stosuje się syntetyczne peptydy SIS jako standardy wewnętrzne, mają niezrównaną specyficzność analityczną do ilościowego oznaczania biomarkerów białkowych, a jednocześnie umożliwiają rozróżnianie izoform, modyfikacji post-translacyjnych (PTM) oraz wnoszą także inne, dodatkowe informacje biologiczne (Addona i in., 2020; Neubert i in., 2020; Wright i Van Eyk, 2017). Stanowi to wyraźny kontrast z biochemicznymi i opartymi na przeciwciałach testami diagnostycznymi, których problemy ze specyficznością, a także inne ograniczenia zostały niedawno mocno podkreślone (Baker, 2015; Hoofnagle i Roth, 2013; Jannetto i Fitzgerald, 2016). Testy oparte na spektrometrii mas, takie jak tutaj opisane, bez etapów wzbogacania próbki, nie mają czułości analitycznej zapewnianej przez testy oparte na przeciwciałach, jednak szybko się to zmienia, ze względu na rozwój spektrometrów, a wprowadzenie testów do analizy białek opartych na spektrometrii mas w laboratorium diagnostycznym, jest niewątpliwie przyszłością (Addona i in., 2020; Hoofnagle i Roth, 2013; Hörber i in., 2020; Jannetto i Fitzgerald, 2016; Wright i Van Eyk, 2017).

W tej pracy ustalono, które z 53 białek obecnie stosowanych w praktyce klinicznej lub będących potencjalnymi markerami białkowymi, do określania etiologii płynu opłucnowego, z największym prawdopodobieństwem sprawdzą się w ukierunkowanym teście opartym na spektrometrii mas. Obejmują one około 20 białek o średniej i wysokiej abundancji, które można z łatwością wykryć wykorzystując prostą metodę przygotowania próbki, co sprawia, że podejście według wynalazku można bez trudu przenieść do standardowego klinicznego systemu LC-MS.

Wykazano tutaj, że podejście multipleksowe z klasyfikatorem wieloklasowym wykorzystującym do około 15 cech, ulepsza zdolność do rozróżniania płynów w porównaniu z zastosowaniem pojedynczych markerów. Ostatnio wykazano, że przewidywanie etiologii płynu opłucnowego jest istotnym wyzwaniem, zależnym od wielu

czynników oraz że analiza wielu biomarkerów diagnostycznych równocześnie, pomaga w grupowaniu płynów opłucnowych (Ferreiro i in., 2020). Podobnie jak w przedstawionych tu wynikach, ponad połowa wysięków nowotworowych grupowała się z przesięgami i wysiękami infekcyjnymi, a wysięki infekcyjne często grupowały się z gruźliczymi i innymi płynami opłucnowymi, podczas gdy wysięki gruźlicze skupiały się głównie w odrębnej grupie. Pomimo tak dużego wyzwania, jakie stanowi różnicowanie etiologii płynów opłucnowych, wykazano tutaj, że podejście oparte na spektrometrii mas posiada wartość diagnostyczną.

Wartości AUC dla klasyfikacji pięciu grup płynów opłucnowych, wynoszą od 0,842 do 0,869, przy średniej dokładności prawidłowej diagnozy wynoszącej 80 %. Test jest najlepszy w diagnozowaniu wysięku gruźliczego (LR+: 12,6), a następnie w diagnozowaniu wysięku nowotworowego (LR+: 7,1). Natomiast jego zdolność do poprawy diagnostyki wysięków infekcyjnych i związanych z niewydolnością narządów (głównie przesięków), jest mniejsza. Możliwość wykluczenia danej etiologii była niska dla wszystkich grup, co oznacza, że brak obecności markerów w płynie nie jest tak dobry we wskazywaniu wyników prawdziwie ujemnych, jak jest wykrycie ich obecności we wskazywaniu wyników prawdziwie dodatnich. Powyższy test byłby zatem najlepszy do różnicowania etiologii nowotworowej lub gruźliczej, co rzeczywiście stanowi obecnie największe wyzwanie, ponieważ oba płyny na ogół mają charakter wysięku limfocytarnego (Mercer i in., 2019). Badanie cytologiczne płynu do wykrywania wysięków nowotworowych ma czułość poniżej 60 %, natomiast testy płynu w kierunku gruźlicy opłucnej, takie jak metody mikrobiologiczne, trwają tygodnie, a testy oparte na PCR mają czułość poniżej 23-63 % (José M. Porcel, 2016, 2018). W grupie analizowanych przez nas próbek płynów opłucnowych dodatni wynik cytologii uzyskano jedynie dla 24 % wysięków nowotworowych. W przeciwieństwie do tego, test według wynalazku (przy 100 % swoistości) umożliwił zidentyfikowanie 55 % wysięków nowotworowych i 67 % wysięków gruźliczych. Na podstawie tego jednośrodkowego badania płynów opłucnowych pochodzących od kohorty pacjentów po torakocentezie, można stwierdzić, że zdolność diagnostyczna testu według wynalazku dla wspomnianych wcześniej dwóch etiologii jest na tym samym poziomie lub lepsza od obecnie stosowanych testów laboratoryjnych, a przy tym wymaga mniej czasu na uzyskanie wyniku.

CDH1 był najlepszym markerem, specyficznym dla płynów nowotworowych. Oprócz CDH1, różnicowanie płynów nowotworowych od płynów infekcyjnych (w tym gruźliczych), wspierały THBS4, MSLN oraz SVEP1. MUC1, HPX, SPINT1, CK-8, CK-18, CK-19, ALCAM (antygen CD166) i SERPINA4 dodatkowo odróżniały płyny

nowotworowe, przy czym MUC1 był z nich najskuteczniejszy. Klasyfikator jako główne cechy używał CDH1, MUC1, THBS4, MSLN i HPX (w przedstawionej kolejności). Jednak HPX był również podwyższony w „innych płynach infekcyjnych” i odróżniał je od płynów gruczliczych. SVEP1 był również jedynym podwyższonym markerem i umożliwiającym odróżnienie płynów opłucnowych związanych z niewydolnością narządów („płyny łagodne”) od płynów infekcyjnych. SPINT1, CK-8, CK-18, CK-19, ALCAM i SERPINA4 nie znalazły się wśród 15 najważniejszych cech. Może to wynikać z ich mniejszej istotności lub z tego, że klasyfikator używa „zachłannego algorytmu” do konstruowania drzew, unikając w ten sposób użycia zbędnych cech. Markery te mogą działać lepiej z bardziej czułym spektrometrem mas lub przy wprowadzeniu etapu wzbogacania próbki, jak wykazano wcześniej dla markerów cytokeratynowych ze względu na ich mniejszą abundancję w płynie opłucnowym (Domanski i in., 2016; Perzanowska i in., 2018).

CDH1 (E-kadheryna) będąca składnikiem połączeń przylegających odgrywa ważną rolę w adhezji międzykomórkowej tkanek nabłonka. Jest potencjalnym biomarkerem do diagnostyki zaawansowanego raka jelita grubego, w surowicy krwi (Weiß i in., 2011). Odnotowano, że jej poziom jest podwyższony w płynach nowotworowych i została wybrana jako jeden z sześciu najlepszych, potencjalnych biomarkerów oprócz SPINT1, MUC1, THBS4, ALCAM (antygen CD166) i SVEP1 (C.-D. Chen i in., 2014), które przetestowano w przedstawionym tu badaniu. Przedstawione tu wyniki generalnie potwierdzają wyniki Chen i in., chociaż różnią się one osiągniętymi zdolnościami do rozróżniania płynów. Chen i in. przeprowadzili analizę MRM na 82 płynach opłucnowych i zastosowali etap wzbogacania próbki. Odnotowali SPINT1 (AUC: 0,916), CDH1 (AUC: 0,815) i MUC1 (AUC: 0,807) jako główne markery pozwalające na rozróżnienie płynów nowotworowych, spowodowanych wyłącznie przez gruczolaka. Ponadto, jako kontrolę w tym badaniu zastosowali płyny gruczlicze, płyny parapneumoniczne i paranowotworowe (płyny opłucnowe związane z nowotworem płuca, ale bez stwierdzonych przerzutów), co zapewne podwyższyło uzyskane wartości AUC. Na podstawie modelu regresji logistycznej wybrali najlepszy panel 3-markerowy, składający się z SPINT1, SVEP1 i THBS4 (AUC: 0,951). W opisanym tu badaniu analizowano także płyny opłucnowe związane z niewydolnością narządów („płyny łagodne”), stanowiących głównie przesięki, które również wykazują wyższy poziom SVEP1, co czyni ten marker niespecyficznym dla płynów nowotworowych, lecz prawdopodobnie jego poziom jest niższy w płynach infekcyjnych. SVEP1 jest ważną cząsteczką adhezyjną komórek, regulującą adhezję międzykomórkową, uczestniczącą w progresji raka (L. Chen i in., 2020;

Shur i in., 2007). THBS4 jest zewnątrzkomórkowym białkiem wiążącym wapń, biorącym udział w interakcjach komórka-komórka i komórka-macierz, i stwierdzono jego nadekspresję w zrębie nowotworowym gruczolaka żołądka typu rozlanego wydzielanym przez fibroblasty związane z rakiem oraz w podścielisko inwazyjnego raka sutka (Förster i in., 2011; McCart Reed i in., 2013). MUC1, znany również jako antygen nowotworowy 15-3 (CA 15-3), jest dużą glikoproteiną przezbłonową, ulegającą ekspresji na powierzchni wierzchołkowej najprostszycy komórek wydzielniczych nabłonka, która ulega autoodszczerpieniu na dwie podjednostki (MUC1-N i MUC1-C) (Hatstrup i Gendler, 2008), a jego nadekspresja występuje w różnych nowotworach, w tym nowotworze płuca (Nath i Mukherjee, 2014). Krążący MUC1-N, który zawiera peptyd analizowany w końcowym teście według wynalazku, jest używany jako serologiczny marker (CA 15-3) stosowany w praktyce klinicznej do monitorowania raka sutka (Kufe, 2009). CA 15-3 stosowany w praktyce klinicznej, w panelu wraz z trzema innymi markerami nowotworowymi (CEA, CA 125 i CYFRA 21-1 (CK-19); wszystkie badane w teście według wynalazku) oceniano pod kątem użyteczności do diagnostyki płynów nowotworowych, a CA 15-3 analizowany samodzielnie, miał najlepszą spośród nich czułość na poziomie 30 % (przy 100 % swoistości). Połączenie wszystkich czterech markerów razem dało czułość 54 % (José Manuel Porcel i in., 2004), co jest porównywalne do wyniku uzyskanego dla klasyfikatora według wynalazku, wynoszącego 55 % (przy 0 FPR). HPX jest powszechnie występującą glikoproteiną osocza wiążącą hem, z tą ważną fizjologiczną rolą wymaganą do zapobiegania uszkodzeniom oksydacyjnym podczas hemolizy (Tolosano i Altruda, 2002). Poziom HPX był wyższy w płynach nowotworowych (gruczolakorak/ niedrobnokomórkowy rak płuca) w porównaniu z płynami gruźliczymi/ parapneumonicznymi (Rodríguez-Piñeiro i in., 2010; Z. Wang i in., 2012), ale jest to także białko reagujące w ostrej fazie, indukowane po zapaleniu (Tolosano i Altruda, 2002), co może wyjaśniać obserwacje tu opisane, że jest ono również podwyższone w innych płynach infekcyjnych. MSLN jest normalnie produkowany głównie przez komórki mezotelialne, lecz także jest antygenem związanym z nowotworem, ulegającym nadekspresji na różnych złośliwych komórkach nowotworowych, w tym złośliwym międzybłoniaku opłucnej (Creaney i Robinson, 2017). Jest to marker surowicy stosowany do monitorowania międzybłoniaka opłucnej. Badania wykazują także jego wyższy poziom w płynach opłucnowych u pacjentów z złośliwym międzybłoniakiem opłucnej, natomiast odnotowano także wiele fałszywie dodatnich wyników w innych płynach nowotworowych (Hooper i in., 2013; Miettinen i Sarlomo-Rikala, 2003). Analiza guzów płuca wykazała, że MSLN ulegał nadekspresji w połowie

gruczolakoraków, w rakach wielkokomórkowych i raku płaskonabłonkowym, ale nadekspresja nie występowała w raku drobnokomórkowym (Mettinen i Sarlomo-Rikala, 2003). Zostało to dokładnie zaobserwowane w opisanym tu badaniu, opartym tylko na analizie płynu opłucnowego i jest prawdopodobnie powodem, dla którego MSLN jest jednym z głównych markerów ogólnej klasyfikacji płynów nowotworowych.

ADA2, CXCL10 i WARS były głównymi białkami, które odróżniały płyny gruźlicze od wszystkich innych płynów opłucnowych i jedynymi białkami, które istotnie odróżniały płyny gruźlicze od innych płynów infekcyjnych. WARS jest indukowaną interferonem- $\gamma$ , cytoplazmatyczną formą syntetazy tryptofanylo-tRNA. WARS była podwyższona w ludzkich makrofagach zakażonych *Mycobacterium tuberculosis* oraz w surowicy krwi pacjentów z aktywną gruźlicą płuc, będąc jednym z trzech najlepszych, potencjalnych biomarkerów gruźlicy (De Groote i in., 2017; Diaz i in., 2016). W obecnym wynalazku po raz pierwszy stwierdzono, że WARS jest również podwyższona specyficznym, szczególnie w płynach gruźliczych, a przy wartości AUC wynoszącej 0,832 wykazuje wysoki potencjał do identyfikacji tych płynów. CXCL10, znana również jako białko indukowane interferonem- $\gamma$  10 kDa (IP-10), jest cytokiną należącą do rodziny chemokin CXC (M. Liu i in., 2011). Przyciąga do miejsc objętych stanem zapalnym monocyty i aktywowane limfocyty T, i sprzyja selektywnemu wzmocnieniu odpowiedzi Th1 i zwiększonej produkcji IFN- $\gamma$ . Podwyższony poziom CXCL10 w płynach gruźliczych, podobnie jak ADA i IFN- $\gamma$ , wskazuje na ostrą chorobę i jest sugerowany jako dodatkowy marker diagnostyczny (K.-Y. Chen i in., 2016; Dheda i in., 2009; Roofchayee i in., 2021). Siedem wcześniejszych badań, w których stężenie CXCL10 mierzono metodą ELISA, wykazało średnią czułość 84 % i swoistość 90 % w identyfikacji płynu gruźliczego (José M. Porcel, 2016). Również przy 90 % swoistości, odnotowana w opisanym tu badaniu czułość dla CXCL10 wynosi 71 % (AUC: 0,880), ale użycie klasyfikatora podnosi je odpowiednio do 94 % i 75 %. ADA2 miała najwyższą moc dyskryminacyjną (AUC: 0,881) i była najwyżej ocenianą cechą klasyfikatora. Deaminaza adenozyńska (ADA), reprezentowana przez dwa izoenzymy (ADA1 i ADA2), bierze udział w metabolizmie puryn i katalizuje deaminację adenozyny do inozyny, cząsteczki sygnałowej, która ma kluczowe znaczenie dla rozwoju układu limfatycznego (Cristalli i in., 2001). ADA1 stanowi większość wewnątrzkomórkowej aktywności ADA, podczas gdy ADA2 jest wydzielana specyficznym przez układ komórek monocytów-makrofagów oraz limfocyty T i jest dominującym izoenzymem w płynach gruźliczych (Bielsa i in., 2013; Cristalli i in., 2001; Zemlin i in., 2009). Przydatność pomiaru całkowitej aktywności ADA w diagnostyce gruźlicy opłucnej została po raz pierwszy opisana w 1978 roku i do dziś

pozostaje najbardziej wyspecjalizowanym biomarkerem płynu gruźliczego (José M. Porcel, 2016). Z pięciu metaanaliz wynika, że pomiar aktywności ADA w płynie opłucnowym ma czułość 92 % i swoistość 90 % (José M. Porcel, 2016). Wykazano, że pomiar aktywności ADA2 jest lepszy niż pomiar całkowitej aktywności (Zemlin i in., 2009), jednak w testach stosowanych w praktyce klinicznej nadal mierzy się całkowitą aktywność ADA. Test według wynalazku ma zdolność do rozróżniania dwóch izoenzymów i nie wykrywano ADA1 w żadnym z badanych płynów opłucnowych, z celowanymi trzema peptydami. Pomimo, że może to być kwestią limitu detekcji testu, fakt ten potwierdza, że ADA2 dominuje w płynach gruźliczych. ADA1 jest również wytwarzany przez neutrofile i występuje głównie w niegruźliczych płynach opłucnowych, takich jak zaawansowane płyny parapneumoniczne i ropniaki, i jest odpowiedzialny za większość testów fałszywie dodatnich w niegruźliczych płynach opłucnowych (José M. Porcel, 2016; Zemlin i in. al., 2009). Pomimo, że takie płyny opłucnowe są zwykle łatwe do odróżnienia przez lekarzy i dlatego ropniaki zostały wykluczone z opisanego tu badania, monitorowanie obu izoenzymów może zwiększyć wartość diagnostyczną.

Płyny parapneumoniczne są wtórne do zapalenia płuc lub innych infekcji płuc i wymagają szybkiej diagnozy, ze względu na wyższą śmiertelność wśród pacjentów z towarzyszącym płynem opłucnowym (Feller-Kopman i Light, 2018). „Złotym standardem” w diagnozowaniu infekcji opłucnej jest hodowla mikroorganizmu, jednak 40 % aspiratów daje fałszywie ujemny wynik, a sama metoda wymaga znacznej ilości czasu, natomiast wyniki szybszych testów biochemicznych mogą być podobne do tych uzyskanych dla płynów nowotworowych (Mercer i in., 2019). Siedem białek związanych z infekcją/zapaleniem w teście według wynalazku, S100A9, VIM, LGALS1, APCS, MMP9, LDHA i CRP, było podwyższonych w płynach gruźliczych i innych płynach infekcyjnych. Inne płyny infekcyjne nie miały żadnych specyficznych, podwyższonych markerów, ale S100A9, APCS i CRP były najważniejszymi białkami do ich klasyfikacji, w przeciwieństwie do tego, co obserwowano dla płynów gruźliczych. Ponadto niski poziom CXCL10, ADA2 i WARS oraz wyższy poziom HPX skutecznie odróżniał inne płyny infekcyjne od płynów gruźliczych. Klasyfikator wybrał CRP, S100A9 i VIM jako najważniejsze cechy do rozróżniania innych płynów infekcyjnych i mógł równie skutecznie odróżnić tę grupę (AUC: 0,863), tak jak płyny gruźlicze (AUC: 0,859) lub wszystkie płyny infekcyjne (AUC: 0,869). Dla porównania, modele prognostyczne oparte na klinicznych pomiarach CRP, IL-6 i liczby komórek neutrofilei/leukocytów identyfikowały płyny infekcyjne z wartością AUC na poziomie 0,898-0,909 (Ferreiro i in., 2019).

S100A9 jest białkiem wiążącym wapń, które występuje głównie jako heterodimer S100A8/A9 (kalprotektyna) i jest wydzielane przez neutrofile i monocyty modulując procesy zapalne poprzez stymulowanie rekrutacji leukocytów i indukowanie wydzielania cytokin, mające potencjał jako marker diagnostyczny dla chorób związanych ze stanem zapalnym (S. Wang i in., 2018). APCS (składnik surowicy amyloidu P lub SAP) jest białkiem osocza, które podobnie jak CRP należy do rodziny pentraksyn białek wiążących ligandy zależne od wapnia i jest związane z kilkoma patogennymi stanami amyloidu (Pepys, 2018). Hamuje przemieszczanie się neutrofilii do tkanek, sprzyja rozwiązywaniu stanów zapalnych i zwłóknienia, promuje fagocytozę i reguluje różnicowanie makrofagów (Pilling i Gomer, 2018). Wyższe poziomy S100A9 i APCS wykryto w płynach parapneumonicznych (a także w płynach gruźliczych w przypadku APCS) w porównaniu z płynami nowotworowymi (gruczolakoraka) (Z. Wang i in., 2012). Obserwacje te zostały potwierdzone na większym i bardziej zróżnicowanym zestawie płynów opłucnowych według wynalazku.

CRP jest białkiem ostrej fazy zapalenia, wykorzystywanym w praktyce klinicznej jako marker infekcji i incydentów sercowo-naczyniowych (Sproston i Ashworth, 2018). Był on podwyższony w płynach infekcyjnych, w tym gruźliczych, parapneumonicznych i ropniakach, w porównaniu do płynów nowotworowych i przesięków (Izhakian i in., 2016; J.M. Porcel i in., 2009; Watanabe i in., 2018). Metaanaliza 18 publikacji wykazała rozsądną zdolność diagnostyczną CRP dla płynów parapneumonicznych (AUC: 0,88, czułość 80 %, swoistość 82 %) (Li i in., 2019). VIM to pośrednie białko filamentowe typu III zaangażowane w utrzymywanie integralności komórkowej i inne procesy, takie jak przyłączanie, migracja i sygnalizacja komórek (Ramos i in., 2020; Satelli i Li, 2011). Klasycznie, jest markerem przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT), wiąże się ze złym rokowaniem i stwierdzono jego nadekspresję w różnych nowotworach nabłonkowych, w tym raku płuca (Satelli i Li, 2011). VIM był podwyższony na powierzchni ludzkich monocytów zakażonych *M. tuberculosis* i jako ligand pośredniczył w ich lizie przez komórki NK (Diaz i in., 2016; Garg i in., 2006). Chociaż sporadycznie obserwowano tu wysoki poziom VIM w płynach nowotworowych, w tym związanych z gruczolakorakiem, rakiem płaskonabłonkowym, rakiem drobnokomórkowym, międzybłoniakiem i wtórnymi nowotworami, poziomy VIM były przede wszystkim podwyższone w płynach infekcyjnych, jak zaobserwowano we wcześniejszym badaniu (Domanski i in., 2016). Klasyfikator wybrał VIM jako drugą najważniejszą cechę dla całej grupy płynów infekcyjnych, zaraz po S100A9. Zamiast markerem raka, sugeruje się tu, aby VIM był klasyfikowany jako marker infekcji w płynie opłucnowym, co jest również

zgodne z badaniem przeprowadzonym przez Kanaji i in., w którym VIM nie odróżniał płynów nowotworowych od płynów nienowotworowych (Kanaji i in., 2019). LGALS1, MMP9 i LDHA nie były tak skuteczne w odróżnianiu innych płynów infekcyjnych od wszystkich płynów opłucnowych jak wymienione wyżej markery, ale były istotnie podwyższone. LGALS1 (Galectin-1) to lektyna o funkcjach przeciwzapalnych (Camby i in., 2006; Sundblad i in., 2017). Jej nadekspresja została zaobserwowana w ostrym i przewlekłym zapaleniu, ale także w kilku typach nowotworów, w tym raku płuca, gdzie może wpływać na progresję nowotworu (Astorgues-Xerri i in., 2014; Sundblad i in., 2017). Mundt i in. wykazali nadekspresję LGALS1 w płynach związanych z gruczolakorakiem w porównaniu z płynami związanymi z międzybłoniakiem, podczas gdy Javadi i in. stwierdzili coś wprost przeciwnego, przy czym obaj twierdzili, że LGALS1 jest potencjalnym markerem międzybłoniaka (Javadi i in., 2020; Mundt i in., 2014). W przykładzie według wynalazku zaobserwowano wyższy poziom LGALS1 w trzech z czterech płynów związanych z międzybłoniakiem opłucnej i w niektórych płynach nowotworowych, ale był on dużo bardziej widoczny w płynach infekcyjnych. MMP9 (żelatynaza B) stymuluje lub hamuje proces degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), a jej nadekspresja jest związana z różnymi nowotworami, a także z ostrymi i przewlekłymi chorobami zapalnymi oraz infekcjami (Mondal i in., 2020). MMP9 było podwyższone w płynach gruczolanych w porównaniu z przesiekami i płynami nowotworowymi, i było wytwarzane przez komórki nabłonkowe w ziarniniakach (Park i in., 2005; Jose M. Porcel i in., 2016; Sheen i in., 2009). W tych wcześniejszych badaniach nie analizowano żadnych innych płynów infekcyjnych, podczas gdy w opisanym tu badaniu wykazano, że MMP9, oprócz płynów gruczolanych, jest również podwyższony w wysiękach parapneumonicznych. LDH jest niezbędnym enzymem cytozolowym, odwracalnie przekształcającym pirogronian w mleczan. Jest to homo- lub heterotetramer, tworzący pięć izoenzymów, różniących się udziałem podjednostek LDHA i LDHB oraz rozmieszczeniem tkankowym (Urbańska i Orzechowski, 2019). LDH jest uwalniany przez uszkodzone komórki, a całkowity LDH w surowicy jest bardzo czułym, ale niespecyficznym markerem wielu stanów chorobowych (Erez i in., 2014). Aktywność LDH jest wykorzystywana w różnicowaniu przesieku i wysięku opłucnowego, przy czym wysięki, zwłaszcza skomplikowane wysięki parapneumoniczne i gruczolane, charakteryzują się wyższym LDH (Feller-Kopman i Light, 2018; José M. Porcel i Light, 2006). Opisane wyniki to potwierdziły i dodatkowo wykazały, że podjednostka LDHA dominuje w wysiękach infekcyjnych, a także jest wyższa w wysiękach infekcyjnych niż w wysiękach nowotworowych, w przeciwieństwie do LDHB.

Chociaż często określa się je jako „łagodne” płyny opłucnowe, to przesieki związane z niewydolnością serca, wątroby i nerek wiążą się z 25-50 % śmiertelnością w ciągu roku (Feller-Kopman i Light, 2018). Płyny opłucnowe związane z niewydolnością narządów, pomimo, że nie posiadają żadnych unikalnych, podwyższonych markerów białkowych i wykazują najniższy potencjał dyskryminacyjny, wciąż mogą być skutecznie różnicowane za pomocą niskich poziomów białek, zwłaszcza C9, LDHA, HPX, LDHB i C3. Wydaje się, że jest to powodowane faktem, że te płyny, będące w większości przesiekami, mają niższe całkowite stężenie białek osocza. Białka C9 i C3 są stosowane w praktyce klinicznej jako markery stanu zapalnego i są również zgłaszane odpowiednio jako potencjalny serologiczny marker gruźlicy i jako marker płynów parapneumonicznych (De Groote i in., 2017; Z. Wang i in., 2012). W opisanym tu badaniu wykazano, że są one dobrymi markerami „ogólnego wysięku”, a ich poziomy są niższe w przypadku płynów związanych z niewydolnością narządów. SERPINA4, SERPINF1 i GSN były również sugerowane wcześniej jako potencjalne serologiczne i opłucnowe markery płynu gruźliczego lub płynu związanego z nowotworem złośliwym (De Groote i in., 2017; Lee i in., 2017; Z. Wang i in., 2012). Pomimo detekcji białek SERPINF1 i GSN, uzyskując silne sygnały pochodzące od wielu peptydów we wszystkich próbkach, nie stwierdzono istotnego potencjału dla nich jako markerów jakiegokolwiek specyficznej etiologii.

Podsumowując, przeprowadzono tu porównanie stosowanych w praktyce klinicznej i potencjalnych markerów do klasyfikacji etiologii płynu opłucnowego przy użyciu ukierunkowanej proteomiki opartej na spektrometrii mas, na zbiorze płynów opłucnowych, odzwierciedlającym rzeczywiste warunki panujące w klinice. Wybrano tu najbardziej obiecujące białka, które są odpowiednie do stosowania na platformach opartych na spektrometrach mas w laboratoriach diagnostycznych. Należą do nich: CDH1, MUC1, THBS4 i MSLN dla wysięków nowotworowych; ADA2, CXCL10 i WARS dla wysięków gruźliczych; CRP, S100A9 i VIM dla wysięków parapneumonicznych („inne płyny infekcyjne”); oraz C9, LDHA, HPX, LDHB i C3 dla płynów związanych z niewydolnością narządów (innych niż płuca - „płyny łagodne”), stanowiących głównie przesieki.

Test i opracowany klasyfikator tworzą narzędzie, które jest bardzo skuteczne w potwierdzaniu diagnozy, zwłaszcza w przypadku wysięku nowotworowego lub gruźliczego. Chociaż wydajność diagnostyczna panelu biomarkerów według wynalazku była bardzo podobna do obecnie stosowanych testów diagnostycznych, to tego typu test multipleksowy, mierzący więcej niż jeden marker chorobowy w jednej analizie, stanowi ogromny skok pod względem skrócenia czasu do uzyskania diagnozy, umożliwiając diagnozowanie wielu etiologii za pomocą pojedynczego testu laboratoryjnego.

Ujawniono tu nowe informacje dla wielu markerów odnośnie ich ekspresji w płynie opłucnowym ze względu na większą różnorodność badanych płynów i wykazano, że spektrometria mas może dostarczyć nowych informacji, specyficznych dla izoenzymów. Takie testy oparte na spektrometrii mas, oparte na małoinwazyjnej i w większości przypadków koniecznej (z medycznego punktu widzenia), procedurze torakocentezy i pobieraniu próbki płynu opłucnowego, wykonywane we wczesnym etapie, mogą szybko dostarczyć wiele pomocnych informacji i wskazówek w kierunku dalszych mniej lub bardziej inwazyjnych procedur wymaganych do postawienia ostatecznej diagnozy i wdrożenia odpowiedniego dla danego pacjenta leczenia.

**Tabela 3 . Etiologie badanych płynów opłucnowych (a), dane demograficzne badanej populacji (b) i schemat przedstawiający płyny wybrane do analizy oraz płyny odrzucone z badania (c).** 158 płynów opłucnowych zostało odrzuconych z badania, w tym: 65 ropniaków (łatwo diagnozowanych na podstawie ropnego wyglądu), 55 płynów o nieznannej etiologii, 8 płynów z dwiema lub więcej etiologiami oraz 30 płynów łagodnych (niezdefiniowane przesięki, płyny nienowotworowe i nieinfekcyjne). Do analizy wybrano 209 płynów opłucnowych o zdiagnozowanej etiologii. Łącznie 109 płynów pochodziło od pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem (płyny nowotworowe): w tym 82 płyny od pacjentów z rakiem płuca (65 niedrobnokomórkowych raków płuca (NSCLC) z dalszym podziałem na 33 gruczolakoraki (ADC) i 22 raki płaskonabłonkowe (SCC)) oraz 27 płynów od pacjentów z innymi (wtórnymi) nowotworami. 58 płynów pochodziło od pacjentów z chorobami infekcyjnymi (wszystkie płyny infekcyjne), w tym 25 płynów od pacjentów z zapaleniem płuc, 24 płyny od pacjentów z gruźlicą (płyny gruźlicze), 6 płynów od pacjentów z zapaleniem opłucnej i 3 płyny ropne (bez widocznej ropy). 42 płyny opłucnowe nienowotworowe i nieinfekcyjne (płyny łagodne) pochodziły głównie od pacjentów z niewydolnością narządów, w tym 27 płynów od pacjentów z niewydolnością serca, 5 płynów od pacjentów z niewydolnością nerek, 4 płyny przesiękowe (niezdefiniowane), 2 płyny od pacjentów z zapaleniem stawów i po jednym płynie od pacjentów z zapaleniem trzustki, marskością wątroby, zatorowością płucną i po urazie.

<b>a</b>	<b>b</b>		
<b>Nowotwory</b>	<b>109</b>	<b>Liczba</b>	<b>Mediana</b>
		<b>pacjentów</b>	<b>wieku (lata)</b>
Rak płuca	82	<b>Nowotwory</b>	<b>67</b>
NSCLC	65	Kobiety	42

	ADC	33	Mężczyźni	67	
	SCC	22	<b>Infekcje</b>		<b>58</b>
	SCLC	17	<b>Zapalenie płuc</b>		<b>60</b>
	Inne nowotwory	27	Kobiety	5	
<b>Infekcje</b>		<b>58</b>	Mężczyźni	25	
	Zapalenie płuc	25	<b>Gruźlica</b>		<b>55</b>
	Gruźlica	24	Kobiety	1	
	Zapalenie opłucnej	6	Mężczyźni	23	
	Ropniak opłucnej	3	<b>Zapalenie płuc</b>		<b>51</b>
<b>Niewydolność narządów</b>		<b>42</b>	Kobiety	3	
	Niewydolność serca	27	Mężczyźni	3	
	Niewydolność nerek	5	<b>Ropniak opłucnej</b>		<b>57</b>
	Przebieg	4	Kobiety	1	
	Zapalenie stawów	2	Mężczyźni	2	
	Zatorowość płucna	1	<b>Niewydolność narządów</b>		<b>70,5</b>
	Zapalenie trzustki	1	Kobiety	10	
	Marskość wątroby	1	Mężczyźni	32	
	Uraz	1			

### Bibliografia:

Addona, T., Abbatiello, S., i Carr, S. A. (2020). From Skepticism to Embrace: The Role of Targeted Mass Spectrometry in Validating Proteomics. *Clinical Chemistry*, 66(7), 973–974.

Anatomic pathology lab instruments by Roche Tissue Diagnostics. (n.d.). pobrany 18 października 2021, z <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/product-category/anatomical-pathology.html>

Astorgues-Xerri, L., Riveiro, M. E., Tijeras-Raballand, A., Serova, M., Neuzillet, C., i in. (2014). Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. In *Cancer Treatment Reviews* (Tom 40, Nr 2, str. 307–319). W.B. Saunders.

Baker, M. (2015). Blame it on the Antibodies. *Nature*, 521, 274–275.

Barak, V., Goike, H., Panaretakis, K. W., i Einarsson, R. (2004). Clinical utility of

- cytokeratins as tumor markers. *Clinical Biochemistry*, 37(7), 529–540.
- Bielsa, S., Palma, R., Pardina, M., Esquerda, A., Light, R. W., i in. (2013). Comparison of polymorphonuclear- And lymphocyte-rich tuberculous pleural effusions. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 17(1).
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., i Kiss, R. (2006). Galectin-1: A small protein with major functions. In *Glycobiology (Tom 16, Nr 11)*. Glycobiology.
- Chen, C.-D., Wang, C.-L., Yu, C.-J., Chien, K.-Y., Chen, Y.-T., i in. (2014). Targeted proteomics pipeline reveals potential biomarkers for the diagnosis of metastatic lung cancer in pleural effusion. *Journal of Proteome Research*, 13(6), 2818–2829.
- Chen, K.-Y., Feng, P.-H., Chang, C.-C., Chen, T.-T., Chuang, H.-C., i in. (2016). Novel biomarker analysis of pleural effusion enhances differentiation of tuberculous from malignant pleural effusion. *International Journal of General Medicine*, 9, 183.
- Chen, L., Liu, D., Yi, X., Qi, L., Tian, X., i in. (2020). The novel miR-1269b-regulated protein SVEP1 induces hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis likely through the PI3K/Akt pathway. *Cell Death & Disease* 2020 11:5, 11(5), 1–14.
- Chen, T., i Guestrin, C. (2016). XGBoost: A scalable tree boosting system. *Proceedings of the ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, 13-17-Aug, 785–794.
- Creaney, J., i Robinson, B. W. S. (2017). Malignant Mesothelioma Biomarkers: From Discovery to Use in Clinical Practice for Diagnosis, Monitoring, Screening, and Treatment. *Chest*, 152(1), 143–149.
- Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., i in. (2001). Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors. In *Medicinal Research Reviews (Tom 21, Nr 2, str. 105–128)*. John Wiley i Sons, Inc.
- De Groote, M. A., Sterling, D. G., Hraha, T., Russell, T. M., Green, L. S., i in. (2017). Discovery and validation of a six-marker serum protein signature for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(10), 3057–3071.
- Dheda, K., Van-Zyl Smit, R. N., Sechi, L. A., Badri, M., Meldau, R., i in. (2009). Clinical diagnostic utility of IP-10 and LAM antigen levels for the diagnosis of tuberculous pleural effusions in a high burden setting. *PLoS ONE*, 4(3).
- Diaz, G., Wolfe, L. M., Kruh-Garcia, N. A., i Dobos, K. M. (2016). Changes in the Membrane-Associated Proteins of Exosomes Released from Human Macrophages after *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Scientific Reports*, 6.
- Domanski, D., Perzanowska, A., Kistowski, M., Wojtas, G., Michalak, A., i in. (2016). A Multiplexed Cytokeratin Analysis Using Targeted Mass Spectrometry Reveals Specific

- Profiles in Cancer-Related Pleural Effusions. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 18(7), 399–412.
- Erez, A., Shental, O., Tchebiner, J. Z., Laufer-Perl, M., Wasserman, A., i in. (2014). Diagnostic and prognostic value of very high serum lactate dehydrogenase in admitted medical patients. *Israel Medical Association Journal*, 16(7), 439–443.
- Feller-Kopman, D., i Light, R. (2018). Pleural Disease. *New England Journal of Medicine*, 378(8), 740–751.
- Ferreiro, L., Lado-Baleato, Ó., Suárez-Antelo, J., Toubes, M., San José, M., i in. (2019). Diagnosis of infectious pleural effusion using predictive models based on pleural fluid biomarkers. *Annals of Thoracic Medicine*, 14(4), 254–263.
- Ferreiro, L., Lado-Baleato, Ó., Toubes, M. E., Suárez-Antelo, J., Pose-Reino, A., i in. (2020). Identification of Pleural Response Patterns: A Cluster Analysis. *Archivos de Bronconeumología*, 56(7), 426–434.
- Förster, S., Gretschel, S., Jöns, T., Yashiro, M., i Kemmner, W. (2011). THBS4, a novel stromal molecule of diffuse-type gastric adenocarcinomas, identified by transcriptome-wide expression profiling. *Modern Pathology*, 24(10), 1390–1403.
- Garg, A., Barnes, P. F., Porgador, A., Roy, S., Wu, S., i in. (2006). Vimentin Expressed on *Mycobacterium tuberculosis* -Infected Human Monocytes Is Involved in Binding to the NKp46 Receptor. *The Journal of Immunology*, 177(9), 6192–6198.
- Hattrup, C. L., i Gendler, S. J. (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. In *Annual Review of Physiology* (Tom 70, str. 431–457). *Annu Rev Physiol*.
- Hoofnagle, A. N., i Roth, M. Y. (2013). Clinical review: improving the measurement of serum thyroglobulin with mass spectrometry. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(4), 1343–1352.
- Hooper, C. E., Morley, A. J., Virgo, P., Harvey, J. E., Kahan, B., i in. (2013). A prospective trial evaluating the role of mesothelin in undiagnosed pleural effusions. *European Respiratory Journal*, 41(1), 18–24.
- Hörber, S., Peter, A., Lehmann, R., i Hoene, M. (2020). Evaluation of the first immunosuppressive drug assay available on a fully automated LC-MS/MS-based clinical analyzer suggests a new era in laboratory medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*.
- Izhakian, S., Wasser, W. G., Fox, B. D., Vainshelboim, B., i Kramer, M. R. (2016). The diagnostic value of the pleural fluid C-reactive protein in parapneumonic effusions. *Disease Markers*, 2016.
- Jannetto, P. J., i Fitzgerald, R. L. (2016). Effective use of mass spectrometry in the clinical laboratory. In *Clinical Chemistry* (Tom 62, Nr 1, str. 92–98). *American Association for*

Clinical Chemistry Inc.

Javadi, J., Dobra, K., i Hjerpe, A. (2020). Multiplex soluble biomarker analysis from pleural effusion. *Biomolecules*, 10(8), 1–13.

Kanaji, N., Kadota, K., Tadokoro, A., Inoue, T., Watanabe, N., i in. (2019). Serum CYFRA 21-1 but not Vimentin is Associated with Poor Prognosis in Advanced Lung Cancer Patients. *The Open Respiratory Medicine Journal*, 13(1), 31–38.

Kufe, D. W. (2009). Mucins in cancer: Function, prognosis and therapy. In *Nature Reviews Cancer* (Tom 9, Nr 12, str. 874–885). *Nat Rev Cancer*.

Lee, C. Y., Hong, J. Y., Lee, M. G., i Suh, I. B. (2017). Identification of 10 candidate biomarkers distinguishing tuberculous and malignant pleural fluid by proteomic methods. *Yonsei Medical Journal*, 58(6), 1144–1151.

Li, D., Shen, Y., Qin, J., Wan, C., Zeng, N., i in. (2019). Diagnostic performance of C-reactive protein for parapneumonic pleural effusion: a meta-analysis. *Annals of Translational Medicine*, 7(1), 1–1.

Liu, M., Guo, S., Hibbert, J. M., Jain, V., Singh, N., i in. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. In *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Tom 22, Nr 3, str. 121–130). Elsevier.

Liu, P.-J., Chen, C.-D., Wang, C.-L., Wu, Y.-C., Hsu, C.-W., i in. (2015). In-depth Proteomic Analysis of Six Types of Exudative Pleural Effusions for Nonsmall Cell Lung Cancer Biomarker Discovery. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(4), 917–932.

Mandrekar, J. N. (2010). Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(9), 1315–1316.

McCart Reed, A. E., Song, S., Kutasovic, J. R., Reid, L. E., Valle, J. M., i in. (2013). Thrombospondin-4 expression is activated during the stromal response to invasive breast cancer. *Virchows Archiv*, 463(4), 535–545.

Mercer, R. M., Corcoran, J. P., Porcel, J. M., Rahman, N. M., i Psallidas, I. (2019). Interpreting pleural fluid results. In *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London* (Tom 19, Nr 3, str. 213–217). Royal College of Physicians.

Miettinen, M., i Sarlomo-Rikala, M. (2003). Expression of calretinin, thrombomodulin, keratin 5, and mesothelin in lung carcinomas of different types: An immunohistochemical analysis of 596 tumors in comparison with epithelioid mesotheliomas of the pleura. *American Journal of Surgical Pathology*, 27(2), 150–158.

Mohammed, Y., Domański, D., Jackson, A. M., Smith, D. S., Deelder, A. M., i in. (2014). PeptidePicker: A scientific workflow with web interface for selecting appropriate peptides for targeted proteomics experiments. *Journal of Proteomics*, 106, 151–161.

- Moll, R., Divo, M., i Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(6), 705–733.
- Mondal, S., Adhikari, N., Banerjee, S., Amin, S. A., i Jha, T. (2020). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Tom 194, p. 112260). Elsevier Masson.
- Mundt, F., Johansson, H. J., Forshed, J., Arslan, S., Metintas, M., i in. (2014). Proteome Screening of Pleural Effusions Identifies Galectin 1 as a Diagnostic Biomarker and Highlights Several Prognostic Biomarkers for Malignant Mesothelioma. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(3), 701–715.
- Nath, S., i Mukherjee, P. (2014). MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in Molecular Medicine*, 20(6), 332–342.
- Neubert, H., Shuford, C. M., Olah, T. V., Garofolo, F., Schultz, G. A., i in. (2020). Protein biomarker quantification by immunoaffinity liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Current state and future vision. *Clinical Chemistry*, 66(2), 282–301.
- Pan, L., Zhang, X., Jia, H., Huang, M., Liu, F., i in. (2020). Label- Free Quantitative Proteomics Identifies Novel Biomarkers for Distinguishing Tuberculosis Pleural Effusion from Malignant Pleural Effusion. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 14(1), 1900001.
- Park, K. J., Hwang, S. C., Sheen, S. S., Oh, Y. J., Han, J. H., i in. (2005). Expression of matrix metalloproteinase-9 in pleural effusions of tuberculosis and lung cancer. *Respiration*, 72(2), 166–175.
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., i in. (2012). Scikit-learn: Machine Learning in Python. *J Mach Learn Res.*, 12, 2825–2830.
- Pepys, M. B. (2018). The pentraxins 1975-2018: Serendipity, diagnostics and drugs. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 2382.
- Perzanowska, A., Fatałska, A., Wojtas, G., Lewandowicz, A., Michalak, A., i in. (2018). An MRM-Based Cytokeratin Marker Assay as a Tool for Cancer Studies: Application to Lung Cancer Pleural Effusions. *Proteomics - Clinical Applications*, 12(2).
- Pilling, D., i Gomer, R. H. (2018). The development of serum amyloid p as a possible therapeutic. In *Frontiers in Immunology* (Tom 9, Nr OCT, p. 2328). Frontiers Media SA.
- Porcel, J. M., Vives, M., Cao, G., Bielsa, S., Ruiz-González, A., i in. (2009). Biomarkers of infection for the differential diagnosis of pleural effusions. *European Respiratory Journal*, 34(6), 1383–1389.
- Porcel, José M. (2016). Advances in the diagnosis of tuberculous pleuritis. In *Annals of Translational Medicine* (Tom 4, Nr 15, p. 9). AME Publishing Company.
- Porcel, José M. (2018). Biomarkers in the diagnosis of pleural diseases: a 2018 update. In

- Therapeutic Advances in Respiratory Disease (Tom 12). SAGE Publications Ltd.
- Porcel, Jose M., Esquerda, A., Martínez-Alonso, M., Bielsa, S., i Salud, A. (2016). Identifying thoracic malignancies through pleural fluid biomarkers: A predictive multivariate model. *Medicine (United States)*, 95(10).
- Porcel, José M., i Light, R. W. (2006). Diagnostic approach to pleural effusion in adults. *American Family Physician*, 73(7), 1211–1220.
- Porcel, José Manuel, Vives, M., Esquerda, A., Salud, A., Pérez, B., i in. (2004). Use of a panel of tumor markers (carcinoembryonic antigen, cancer antigen 125, carbohydrate antigen 15-3, and cytokeratin 19 fragments) in pleural fluid for the differential diagnosis of benign and malignant effusions. *Chest*, 126(6), 1757–1763.
- Ramos, I., Stamatakis, K., Oeste, C. L., i Pérez-Sala, D. (2020). Vimentin as a Multifaceted Player and Potential Therapeutic Target in Viral Infections. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Tom 21, Page 4675, 21(13), 4675.
- Rodríguez-Piñeiro, a. M., Blanco-Prieto, S., Sánchez-Otero, N., Rodríguez-Berrocal, F. J., i Páez de la Cadena, M. (2010). On the identification of biomarkers for non-small cell lung cancer in serum and pleural effusion. *Journal of Proteomics*, 73(8), 1511–1522.
- Roofchayee, N. D., Marjani, M., Dezfuli, N. K., Tabarsi, P., Moniri, A., i in. (2021). Potential diagnostic value of pleural fluid cytokines levels for tuberculous pleural effusion. *Scientific Reports*, 11(1).
- Sabbagh, B., Mindt, S., Neumaier, M., i Findeisen, P. (2016). Clinical applications of MS-based protein quantification. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 10(4), 323–345.
- Satelli, A., i Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(18), 3033–3046.
- Sheen, P., O’Kane, C. M., Chaudhary, K., Tovar, M., Santillan, C., i in. (2009). High MMP-9 activity characterises pleural tuberculosis correlating with granuloma formation. *European Respiratory Journal*, 33(1), 134–141.
- Shur, I., Zemer-Tov, E., Socher, R., i Benayahu, D. (2007). SVEP1 expression is regulated in estrogen-dependent manner. *Journal of Cellular Physiology*, 210(3), 732–739.
- Singh, V., Pencina, M., Einstein, A. J., Liang, J. X., Berman, D. S., i in. (2021). Impact of train/test sample regimen on performance estimate stability of machine learning in cardiovascular imaging. *Scientific Reports*, 11(1), 1–8.
- Sproston, N. R., i Ashworth, J. J. (2018). Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. In *Frontiers in Immunology* (Tom 9, Nr APR, p. 754). Frontiers Media SA.
- Sundblad, V., Morosi, L. G., Geffner, J. R., i Rabinovich, G. A. (2017). Galectin-1: A

- Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *The Journal of Immunology*, 199(11), 3721–3730.
- Tolosano, E., i Altruda, F. (2002). Hemopexin: Structure, function, and regulation. In *DNA and Cell Biology* (Tom 21, Nr 4, str. 297–306). DNA Cell Biol.
- Urbańska, K., & Orzechowski, A. (2019). Unappreciated role of LDHA and LDHB to control apoptosis and autophagy in tumor cells. In *International Journal of Molecular Sciences* (Tom 20, Nr 9). *Int J Mol Sci*.
- Wang, S., Song, R., Wang, Z., Jing, Z., Wang, S., i in. (2018). S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN).
- Wang, Z., Wang, C., Huang, X., Shen, Y., Shen, J., i in. (2012). Differential proteome profiling of pleural effusions from lung cancer and benign inflammatory disease patients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(4), 692–700.
- Watanabe, N., Ishii, T., Kita, N., Kanaji, N., Nakamura, H., i in. (2018). The usefulness of pleural fluid presepsin, C-reactive protein, and procalcitonin in distinguishing different causes of pleural effusions. *BMC Pulmonary Medicine* 2018 18:1, 18(1), 1–9.
- Weiß, J. V., Klein-Scory, S., Kübler, S., Reinacher-Schick, A., Stricker, I., i in. (2011). Soluble E-cadherin as a serum biomarker candidate: Elevated levels in patients with late-stage colorectal carcinoma and FAP. *International Journal of Cancer*, 128(6), 1384–1392.
- Wright, I., & Van Eyk, J. E. (2017). A Roadmap to Successful Clinical Proteomics. *Clinical Chemistry*, 63(1), 245–247.
- Zemlin, A. E., Burgess, L. J., & Carstens, M. E. (2009). The diagnostic utility of adenosine deaminase isoenzymes in tuberculous pleural effusions. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(2), 214–220.
- Zhang, B., Whiteaker, J. R., Hoofnagle, A. N., Baird, G. S., Rodland, K. D., i in. (2019). Clinical potential of mass spectrometry-based proteogenomics. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 16, Nr 4, str. 256–268). Nature Publishing Group.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Panel białkowy składający się z markerów białkowych i odpowiadających im peptydów wymienionych w tabeli 1 do zastosowania w sposobie *in vitro* diagnozowania płynów opłucnowych.

2. Panel białkowy według zastrzeżenia 1, do sposobu *in vitro* diagnozowania płynów opłucnowych, który to panel oznacza się z zastosowaniem opartej na spektrometrii mas (MS) multipleksowanej proteomiki celowanej z użyciem metod MS selektywnego, wielokrotnego lub równoległego monitorowania reakcji (SRM, MRM, PRM).

3. Panel białkowy według zastrzeżenia 1 albo 2, obejmujący markery białkowe o sekwencjach numer: 1 i 2, 4, 5 i 7, 8, 10 i 11, 14, 16 i 17, 18-20, 23, 24-26, 29, 30, 33-35, 36 i 37, 40 i 42, 44 i 45, 48, 50 i 51, 54 i 57, 58, 60 i 61, 63, 67-70, 71, 72 i 75, 79, 80-83, 84-86, 87-89, 90 i 91, 92-94, 95 i 97, 98-102 oraz 104-108.

4. Panel białkowy według któregośkolwiek z zastrzeżeń 1 do 3, który obejmuje wykryty i oznaczony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: kadheryna-1 (CDH1), trombospondyna-4 (THBS4), mezotelina (MSLN), mucyna-1 (MUC1/CA 15-3), domena sushi, czynnik von Willebranda, EGF i białko 1 zawierające domenę pentraksyny (SVEP1), inhibitor proteazy typu Kunitz 1 (SPINT1), hemopeksyna (HPX), antygen CD166 (ALCAM), kallistatyna (SERPINA4), keratyna 8 typu II cytoszkieletu (CK-8), keratyna 18 typu I cytoszkieletu (CK-18), keratyna 19 typu I cytoszkieletu (CK-19), który wskazuje na płyn nowotworowy, czyli płyn związany z nowotworem.

5. Panel białkowy według zastrzeżenia 4, w którym wykryty i oznaczony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: CDH1, MUC1, THBS4, MSLN, HPX, wskazuje na płyn nowotworowy.

6. Panel białkowy według zastrzeżenia 5, w którym wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym CDH1 i odpowiadających jej peptydów wskazuje na płyn nowotworowy.

7. Panel białkowy według któregośkolwiek z zastrzeżeń 1 do 3, w którym wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: deazminaza adenozynowa ADA2, chemokina 10 z motywem C-X-C (CXCL10) i syntetaza tryptofanylo-tRNA, cytoplazmatyczna (WARS), wskazuje na płyn gruźliczy, czyli płyn opłucnowy spowodowany zapaleniem opłucnej w wyniku infekcji *Mycobacterium tuberculosis*.

8. Panel białkowy według zastrzeżenia 7, w którym wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym ADA2 i odpowiadających jej peptydów wskazuje na płyn gruźliczy.

9. Panel białkowy według któregośkolwiek z zastrzeżeń 1 do 3, w którym wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: wimentyna (VIM), galektyna 1 (LGALS1), osoczowe białko amyloidu P (APCS), białko S100A9 (S100A9), metaloproteinaza 9 (MMP9), dehydrogenaza mleczanowa A (LDHA) i białko C-reaktywne (CRP), wskazuje na płyn parapneumoniczny lub inny płyn infekcyjny.

10. Panel białkowy według zastrzeżenia 9, w którym wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: CRP, S100A9, VIM, wskazuje na inny płyn infekcyjny.

11. Panel białkowy według zastrzeżenia 10, wykryty i określony ilościowo, zwiększony poziom w płynie opłucnowym białek lub odpowiadających im peptydów: CRP i S100A9, wskazuje na inny płyn infekcyjny.

12. Panel białkowy według któregośkolwiek z zastrzeżeń 1 do 3, w którym wykryty i określony ilościowo zmieniony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: hemopeksyna (HPX), dehydrogenaza mleczanowa A (LDHA), dehydrogenaza mleczanowa B (LDHB), składowa C3 dopełniacza (C3), składowa C9 dopełniacza (C9), domena Sushi, czynnik von Willebranda typu A, EGF i białko zawierające domenę pentraksyny 1 (SVEP1), wskazuje na płyn łagodny, wynikający z chorób innych niż nowotwory i infekcje.

13. Panel białkowy według zastrzeżenia 12, w którym wykryty i określony ilościowo, obniżony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: LDHA, LDHB, C3, C9, HPX wskazuje na płyn łagodny.

14. Panel białkowy według zastrzeżenia 13, w którym wykryty i określony ilościowo, obniżony poziom w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: LDHA i C9, wskazuje na płyn łagodny.

15. Sposób *in vitro* analizy płynu opłucnowego do diagnozowania jego etiologii, w którym to sposobie wykrywa się i oznacza ilościowo w płynie opłucnowym pobranym od pacjenta panel markerów białkowych wymienionych w tabeli 1, w tym odpowiadających im peptydów, w którym wykrywanie i oznaczenie ilościowe przeprowadza się przy użyciu opartej na spektrometrii mas multipleksowej ukierunkowanej proteomiki, oraz na podstawie obecności i zmiany poziomu markera białkowego lub jego odpowiedniej kombinacji peptydowej określa się etiologię płynu opłucnowego.

16. Sposób według zastrzeżenia 15, w którym analizę płynu opłucnowego przeprowadza się przy użyciu opartej na spektrometrii mas (MS) multipleksowanej celowanej proteomiki z zastosowaniem metod MS selektywnego, wielokrotnego lub równoległego monitorowania reakcji (SRM, MRM, PRM).

17. Sposób według któregokolwiek z zastrzeżeń 15 albo 16, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym markerów białkowych i odpowiadających im peptydów w porównaniu z poziomem stężenia białek lub peptydów odniesienia oznaczonym w grupie odniesienia.

18. Sposób według dowolnego z zastrzeżeń 15 do 17, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo markery białkowe o sekwencjach numer: 1 i 2, 4, 5 i 7, 8, 10 i 11, 14, 16 i 17, 18-20, 23, 24-26, 29, 30, 33-35, 36 i 37, 40 i 42, 44 i 45, 48, 50 i 51, 54 i 57, 58, 60 i 61, 63, 67-70, 71, 72 i 75, 79, 80-83, 84-86, 87-89, 90 i 91, 92-94, 95 i 97, 98-102 oraz 104-108.

19. Sposób według dowolnego z zastrzeżeń 15 do 18, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: kadheryna-1 (CDH1), trombospondyna-4 (THBS4), mezotelina (MSLN), mucyna-1 (MUC1/CA 15-3), domena sushi, czynnik von Willebranda, EGF i białko 1 zawierające domenę pentraksyny (SVEP1), inhibitor proteazy typu Kunitz 1 (SPINT1), hemopeksyna (HPX), antygen CD166 (ALCAM), kallistatyna (SERPINA4), keratyna 8 typu II cytoszkieletu (CK-8), keratyna 18 typu I cytoszkieletu (CK-18), keratyna 19 typu I cytoszkieletu (CK-19), przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na płyn nowotworowy.

20. Sposób według zastrzeżenia 19, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: CDH1, MUC1, THBS4, MSLN, HPX, przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na płyn nowotworowy.

21. Sposób według zastrzeżenia 20, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym CDH1 i odpowiadających jej peptydów, przy czym obecność i zwiększony poziom CDH1 wskazuje na płyn nowotworowy.

22. Sposób według któregokolwiek z zastrzeżeń od 15 do 18, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: deazminaza adenozynowa ADA2, chemokina 10 z motywem C-X-C (CXCL10) i syntetaza tryptofanylo-tRNA, cytoplazmatyczna (WARS), przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na płyn gruczliczy, czyli

płyn opłucnowy spowodowany zapaleniem opłucnej w wyniku infekcji *Mycobacterium tuberculosis*.

23. Sposób według zastrzeżenia 22, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu ADA2 lub odpowiadających jej peptydów w płynie opłucnowym, przy czym jej obecność i zwiększony poziom wskazuje na płyn gruźliczy.

24. Sposób według któregokolwiek z zastrzeżeń od 15 do 18, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: wimentyna (VIM), galektyna 1 (LGALS1), osoczone białko amyloidu P (APCS), białko S100A9 (S100A9), metaloproteinaza 9 (MMP9), dehydrogenaza mleczanowa A (LDHA) i białko C-reaktywne (CRP), przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na płyn parapneumoniczny, inaczej inny płyn infekcyjny.

25. Sposób według zastrzeżenia 24, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: CRP, S100A9, VIM, przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na inny płyn infekcyjny.

26. Sposób według zastrzeżenia 25, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: CRP, S100A9, przy czym ich obecność i zwiększony poziom wskazuje na inny płyn infekcyjny.

27. Sposób według dowolnego z zastrzeżeń od 15 do 18, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: hemopeksyna (HPX), dehydrogenaza mleczanowa A (LDHA), dehydrogenaza mleczanowa B (LDHB), składowa C3 dopełniacza (C3), składowa C9 dopełniacza (C9), domena Sushi, czynnik von Willebranda typu A, EGF i białko zawierające domenę pentraksyny 1 (SVEP1), przy czym ich obecność i zmieniony poziom wskazuje na płyn łagodny, wynikający z chorób innych niż nowotwory i infekcje.

28. Sposób według zastrzeżenia 27, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: LDHA, LDHB, C3, C9, HPX, przy czym ich obecność i obniżony poziom wskazuje na płyn łagodny.

29. Sposób według zastrzeżenia 28, w którym wykrywa się obecność i oznacza ilościowo zmianę poziomu w płynie opłucnowym następujących białek lub odpowiadających im peptydów: LDHA i C9, przy czym ich obecność i obniżony poziom wskazuje na płyn łagodny.

Figura 1

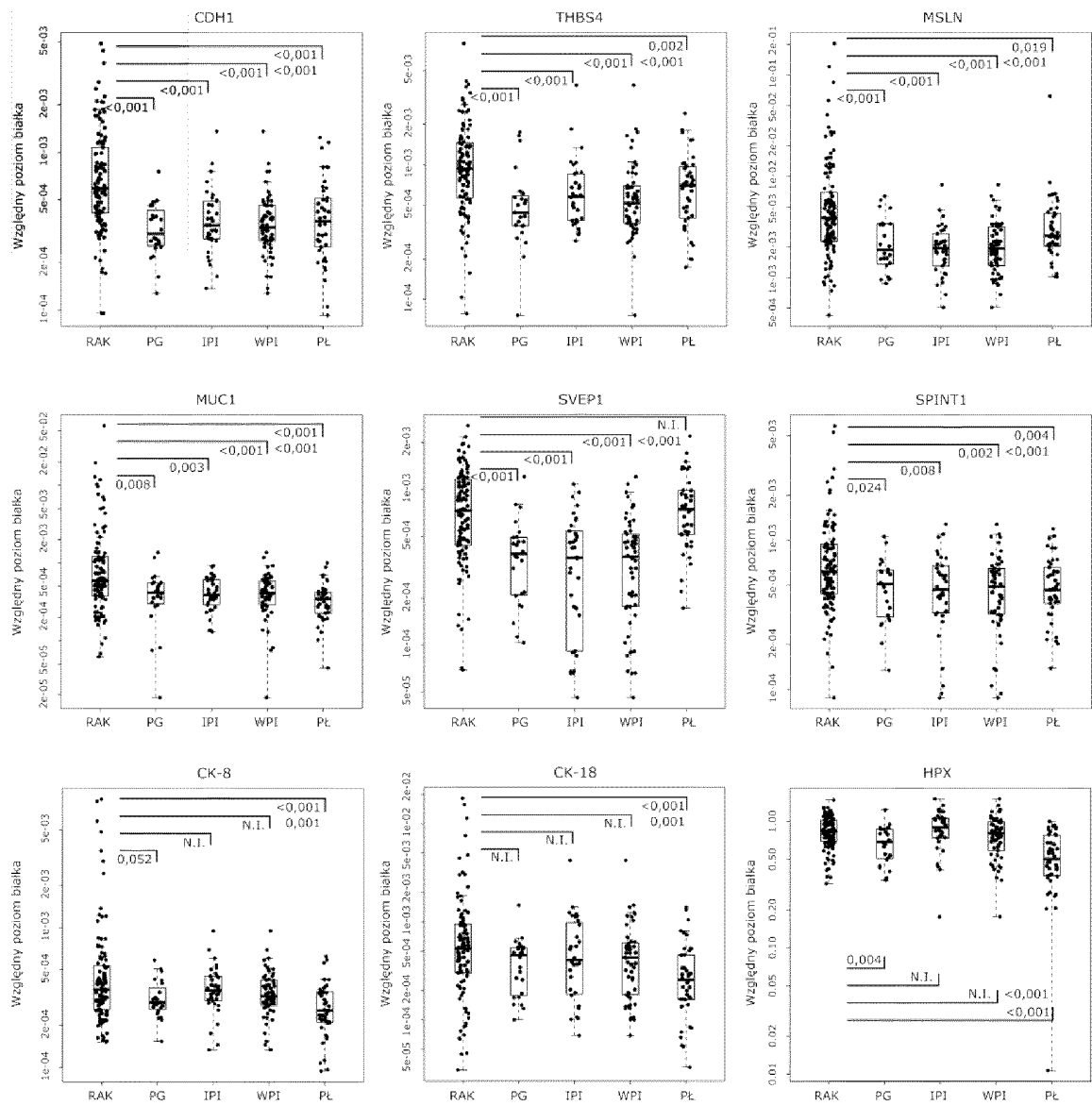


Figura 2

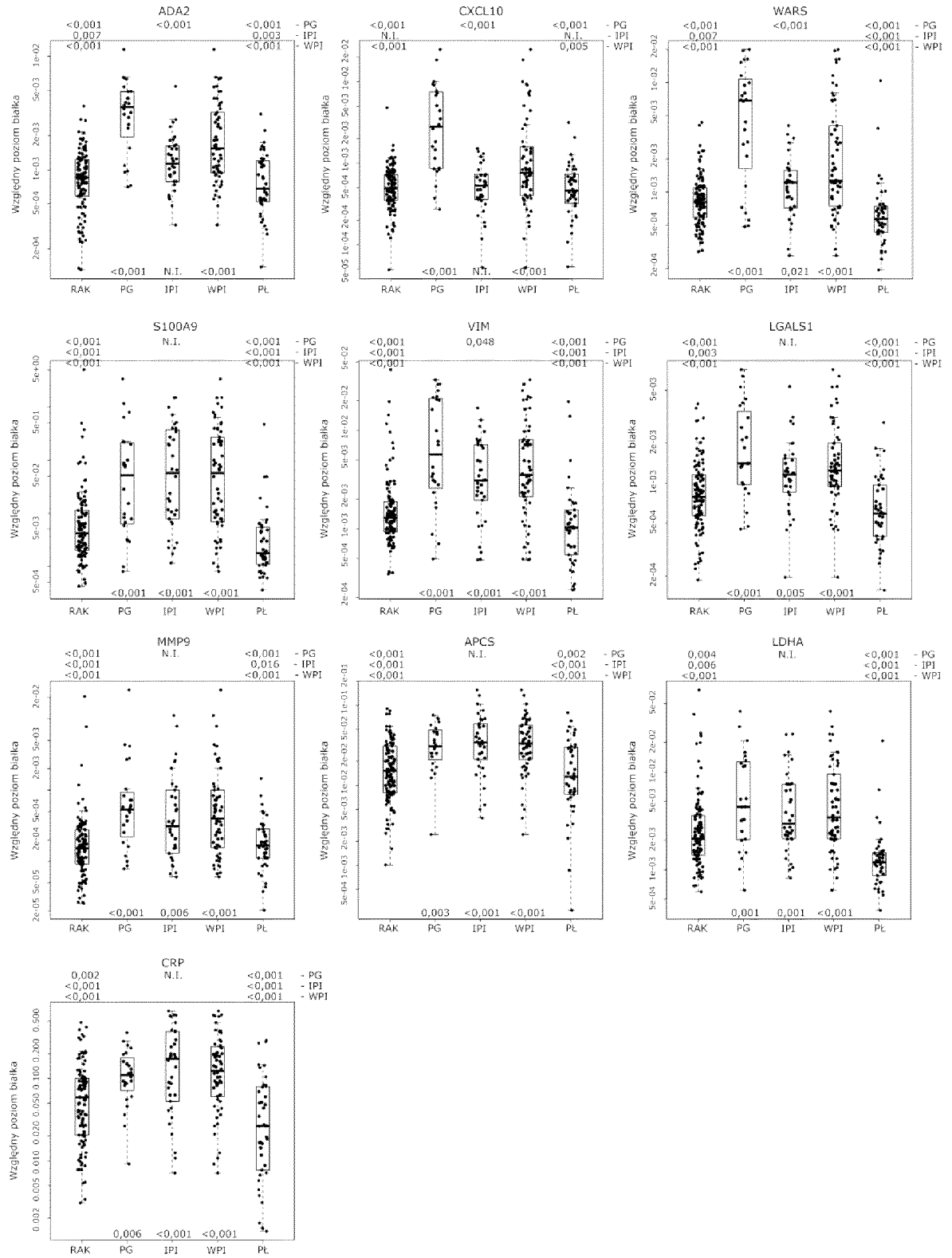


Figura 3

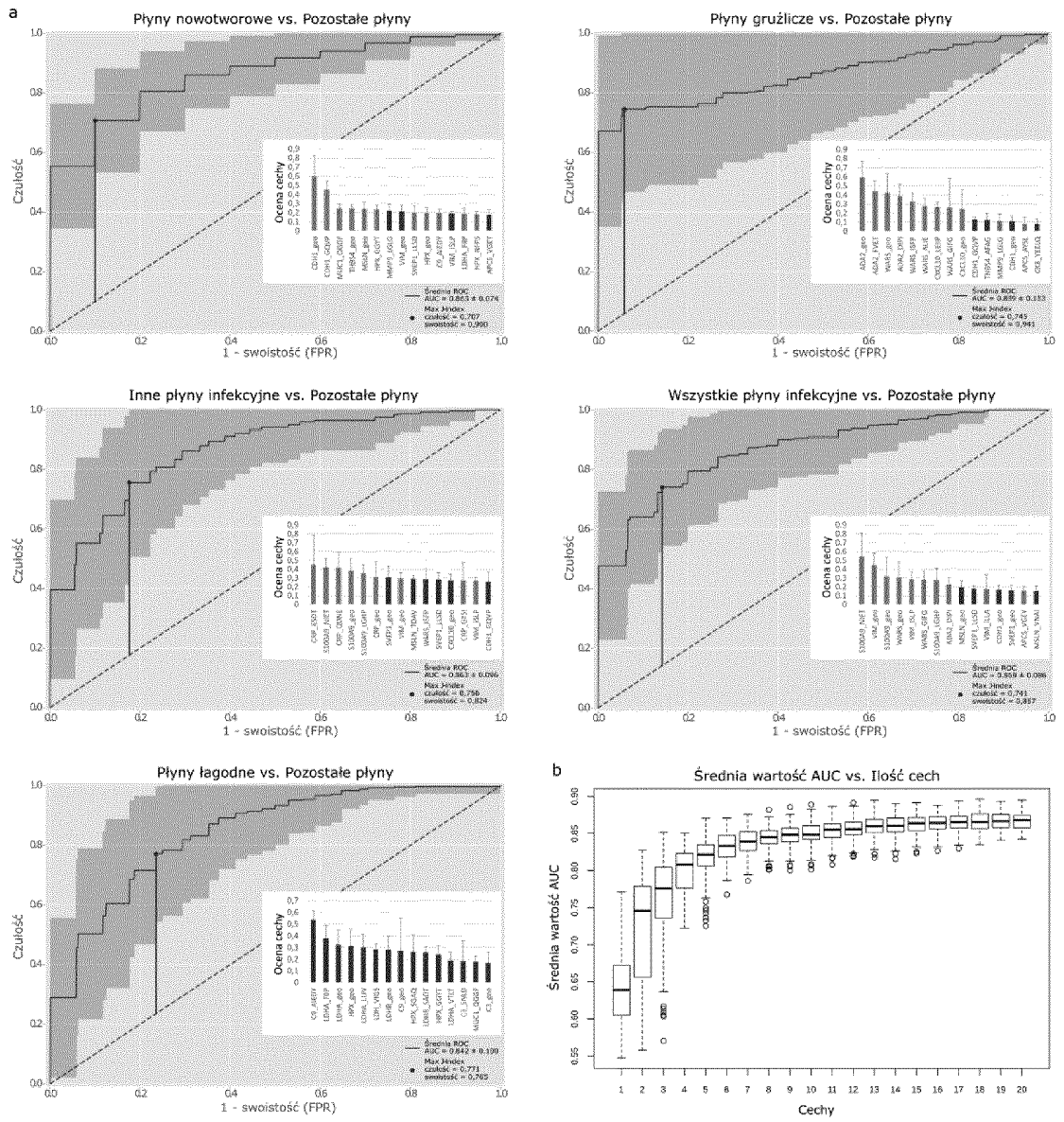


Figura 4

Nowotworowe (n=109):			Gruźlicze (n=24):			Inne infekcyjne (n=34):			Wszystkie infekcyjne (n=58):			Łagodne (n=42):		
Marker	Wartość p	AUC	Marker	Wartość p	AUC	Marker	Wartość p	AUC	Marker	Wartość p	AUC	Marker	Wartość p	AUC
Nowotworowe vs. Pozostałe (n=100):			Gruźlicze vs. Pozostałe (n=185):			Inne infekcyjne vs. Pozostałe (n=175):			Wszystkie infekcyjne vs. Pozostałe (n=151):			Łagodne vs. Pozostałe (n=167):		
CDH1	<0,001	0,766	ADA2	<0,001	0,881	S100A9	<0,001	0,773	S100A9	<0,001	0,795	SVEP1	0,037	0,604
MUC1	<0,001	0,703	CXCL10	<0,001	0,880	APCS	<0,001	0,715	VIM	<0,001	0,793	Pozostałe vs. Łagodne:		
THBS4	<0,001	0,701	WARS	<0,001	0,832	CRP	<0,001	0,712	ADA2	<0,001	0,761	ADA2	<0,001	0,818
MSLN	<0,001	0,698	VIM	<0,001	0,800	VIM	<0,001	0,707	WARS	<0,001	0,753	LDHA	<0,001	0,805
HPX	<0,001	0,661	LGALS1	<0,001	0,767	LDHA	0,001	0,674	APCS	<0,001	0,740	LDHB	<0,001	0,799
SVEP1	<0,001	0,658	MMP9	<0,001	0,753	LGALS1	0,005	0,651	LGALS1	<0,001	0,738	HPX	<0,001	0,789
SPINT1	<0,001	0,651	S100A9	<0,001	0,716	MMP9	0,006	0,650	CRP	<0,001	0,732	C9	<0,001	0,773
CK-18	0,001	0,630	LDHA	0,001	0,704	LDH	0,008	0,644	MMP9	<0,001	0,731	C3	<0,001	0,772
CK-8	0,001	0,629	LDH	0,002	0,698	HPX	0,017	0,630	LDHA	<0,001	0,722	WARS	<0,001	0,740
ALCAM	0,036	0,584	APCS	0,003	0,685	WARS	0,021	0,625	LDH	<0,001	0,698	S100A9	<0,001	0,728
C3	0,037	0,584	CRP	0,006	0,674	C9	0,023	0,623	CXCL10	<0,001	0,665	CRP	<0,001	0,704
CK-19	0,038	0,583	LDHB	0,009	0,664	LDHB	0,034	0,615	C9	<0,001	0,663	CK-8	<0,001	0,701
SERPINA4	0,046	0,580	C9	0,013	0,657	Pozostałe vs. Inne infek.:			LDHB	<0,001	0,661	MUC1	<0,001	0,701
Pozostałe vs. Nowot.:			ALCAM			SVEP1	<0,001	0,751	C3	0,011	0,613	ALCAM	<0,001	0,696
MMP9	<0,001	0,659	Pozostałe vs. Gruźlicze:			MSLN	<0,001	0,723	Pozostałe vs. Wszys. infek.:			VIM	<0,001	0,695
APCS	0,001	0,630	CDH1	<0,001	0,723	CDH1	0,004	0,655	SVEP1	<0,001	0,780	LGALS1	<0,001	0,687
ADA2	0,002	0,627	SVEP1	<0,001	0,715	THBS4	0,022	0,625	MSLN	<0,001	0,730	CK-18	<0,001	0,677
VIM	0,006	0,610	THBS4	0,001	0,705				CDH1	<0,001	0,719	SERPINF1	<0,001	0,672
CXCL10	0,024	0,591	MSLN	0,014	0,654				THBS4	<0,001	0,687	CDH1	0,005	0,640
S100A9	0,025	0,590	CK-19	0,014	0,654				SPINT1	0,015	0,610	ADA2	0,010	0,628
									MUC1	0,043	0,590	SPINT1	0,053	0,598
												APCS	0,051	0,597
Nowot. vs. Gruźlicze:			Gruźlicze vs. Nowot.:			Inne infekcyjne vs. Nowot.:			Wszys. infek. vs. Nowot.:			Łagodne vs. Nowot.:		
CDH1	<0,001	0,822	ADA2	<0,001	0,889	S100A9	<0,001	0,786	VIM	<0,001	0,777	Brak		
SVEP1	<0,001	0,765	CXCL10	<0,001	0,882	VIM	<0,001	0,747	S100A9	<0,001	0,771	Łagodne vs. Gruźlicze:		
THBS4	<0,001	0,758	WARS	<0,001	0,828	APCS	<0,001	0,741	ADA2	<0,001	0,752	SVEP1	<0,001	0,802
MSLN	<0,001	0,722	VIM	<0,001	0,820	CRP	<0,001	0,707	MMP9	<0,001	0,739	Łagodne vs. Inne infek.:		
HPX	0,004	0,690	MMP9	<0,001	0,798	MMP9	<0,001	0,698	APCS	<0,001	0,739	SVEP1	<0,001	0,800
MUC1	0,008	0,673	LGALS1	<0,001	0,775	LGALS1	0,003	0,671	WARS	<0,001	0,726	MSLN	0,004	0,692
CK-19	0,009	0,671	S100A9	<0,001	0,748	LDHA	0,006	0,657	LGALS1	<0,001	0,714	Łagod. vs. Wszys. infek.:		
SPINT1	0,024	0,650	APCS	<0,001	0,737	ADA2	0,007	0,655	CRP	<0,001	0,704	SVEP1	<0,001	0,800
CK-8	0,052	0,627	CRP	0,002	0,700	WARS	0,007	0,654	LDHA	<0,001	0,671	MSLN	0,004	0,670
			LDHA	0,004	0,690	Inne infek. vs. Gruźlicze:			CXCL10	<0,001	0,666			
			LDH	0,012	0,665	HPX	0,008	0,707	LDH	0,005	0,631			
			C9	0,037	0,636	CK-19	0,034	0,664	C9	0,020	0,609			
			Gruźlicze vs. Inne infek.:			CK-8	0,045	0,656						
			CXCL10	<0,001	0,876									
			ADA2	<0,001	0,826									
			WARS	<0,001	0,784									
			ALCAM	0,031	0,668									
			VIM	0,048	0,653									
Nowot. vs. Wszys. infek.:														
CDH1	<0,001	0,789												
SVEP1	<0,001	0,772												
MSLN	<0,001	0,752												
THBS4	<0,001	0,726												
MUC1	<0,001	0,671												
SPINT1	0,002	0,650												
Nowot. vs. Łagodne:			Gruźlicze vs. Łagodne:			Inne infek. vs. Łagodne:			Wszys. infek. vs. Łagod.:					
HPX	<0,001	0,810	ADA2	<0,001	0,906	S100A9	<0,001	0,873	LDH	<0,001	0,871			
LDH	<0,001	0,790	LDH	<0,001	0,880	LDH	<0,001	0,865	S100A9	<0,001	0,858			
LDHA	<0,001	0,777	WARS	<0,001	0,878	LDHA	<0,001	0,857	LDHA	<0,001	0,858			
LDHB	<0,001	0,774	CXCL10	<0,001	0,875	LDHB	<0,001	0,847	LDHB	<0,001	0,846			
C3	<0,001	0,769	VIM	<0,001	0,867	HPX	<0,001	0,810	VIM	<0,001	0,833			
C9	<0,001	0,757	LDHA	<0,001	0,859	VIM	<0,001	0,808	WARS	<0,001	0,823			
MUC1	<0,001	0,747	LDHB	<0,001	0,845	CRP	<0,001	0,803	CRP	<0,001	0,805			
CDH1	<0,001	0,734	LGALS1	<0,001	0,843	WARS	<0,001	0,784	C9	<0,001	0,803			
CK-8	<0,001	0,715	S100A9	<0,001	0,838	C9	<0,001	0,781	LGALS1	<0,001	0,800			
CK-18	<0,001	0,699	C9	<0,001	0,833	LGALS1	<0,001	0,769	ADA2	<0,001	0,784			
WARS	<0,001	0,695	C3	<0,001	0,826	APCS	<0,001	0,746	C3	<0,001	0,776			
ALCAM	<0,001	0,687	CRP	<0,001	0,809	C3	<0,001	0,740	HPX	<0,001	0,748			
THBS4	0,002	0,666	ALCAM	<0,001	0,787	CK-8	0,002	0,712	APCS	<0,001	0,742			
SERPINF1	0,002	0,663	MMP9	<0,001	0,772	SERPINF1	0,003	0,702	ALCAM	<0,001	0,713			
S100A9	0,002	0,659	APCS	0,002	0,735	ADA2	0,003	0,697	MMP9	<0,001	0,707			
SPINT1	0,004	0,652	SERPINF1	0,024	0,668	MMP9	0,016	0,662	SERPINF1	0,001	0,688			
CRP	0,004	0,651	HPX	0,030	0,662	ALCAM	0,016	0,662	CK-8	0,003	0,676			
LGALS1	0,015	0,628				CK-18	0,034	0,644	CXCL10	0,005	0,664			
MSLN	0,019	0,624							CK-18	0,024	0,634			
VIM	0,020	0,622							MUC1	0,049	0,616			

**Figura 5**

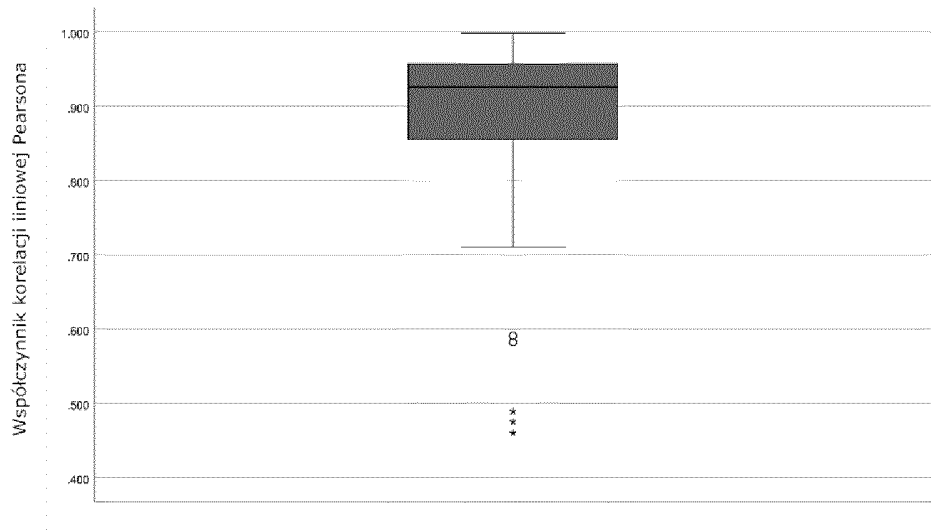


Figura 6

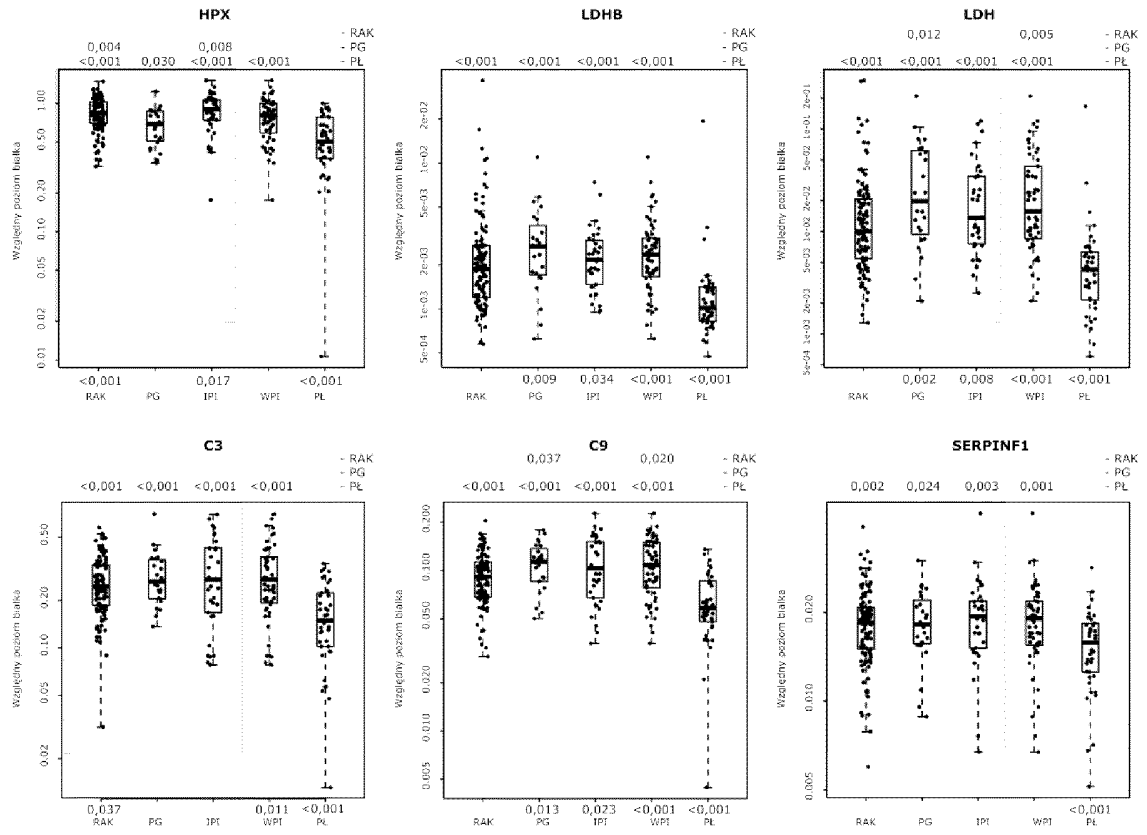


Figura 7

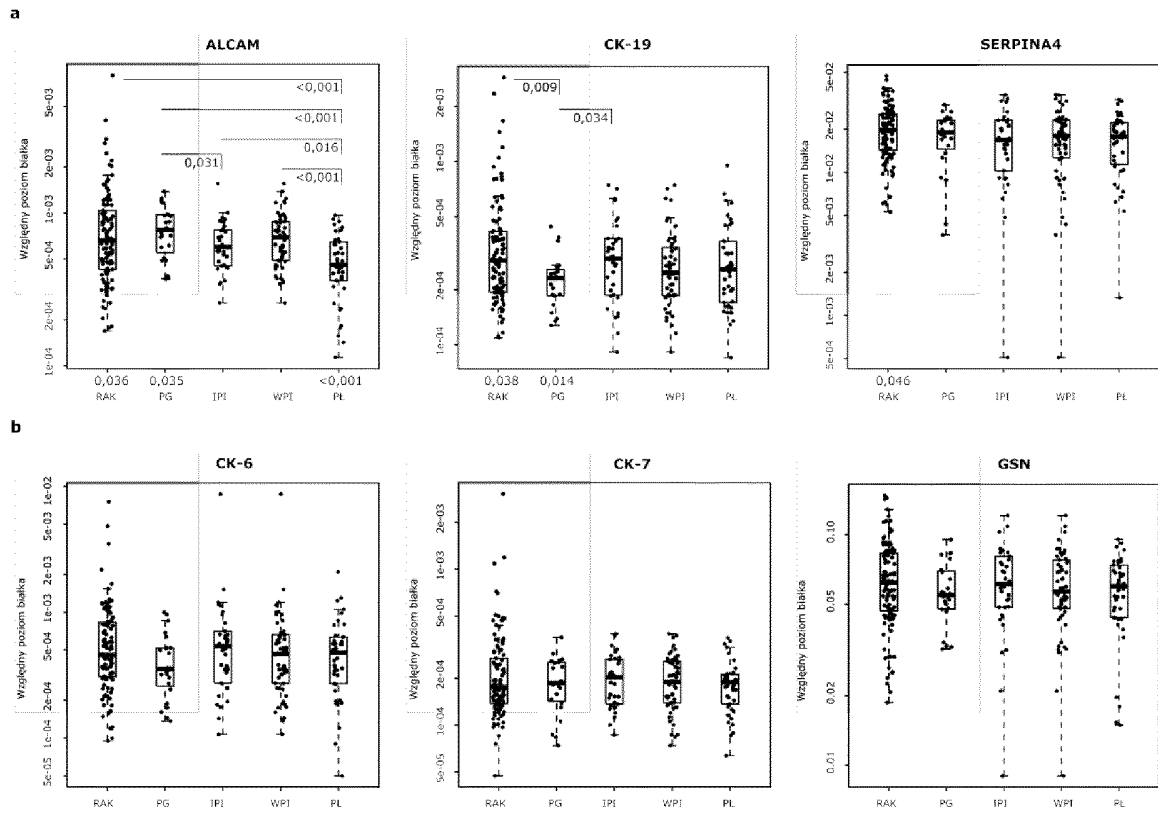


Figura 8

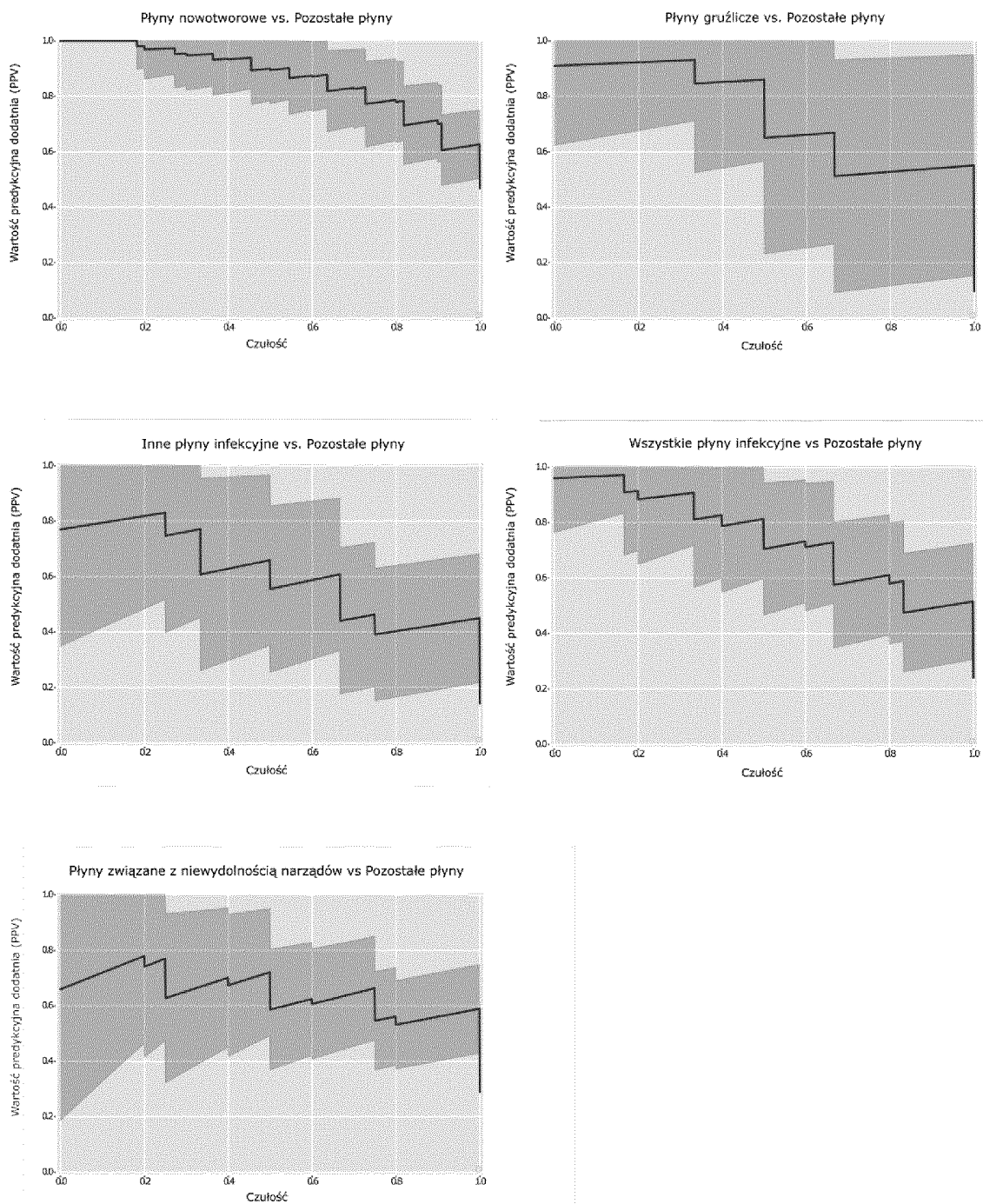


Figura 9

Nazwa białka (skrót używany w tekście) [nazwa genu, identyfikator UniProt]	Celowane peptydy do analizy MRM (Pozycja peptydu w białku)
<b>Antygen karcynoembrionalny (CEA/CEACAM5)</b> [CEACAM5, P06731] Długość: 702 aa, Masa (Da): 76 795	QIIGYVIGTQQATPGPAYSGR (78-98) SDLVNEEATGQFR (127-139) NDTASYK (208-214) LQLSNDNR (369-376) INGIPQQHTQVLFIAK (629-644)
<b>Dipeptydylopeptydaza 4 (DPP4)</b> [DPP4, P27487] Długość: 766 aa, Masa (Da): 88 279	FRPSEPHFTLDGNSFYK (357-373) VLEDNSALDK (493-502) LGTFEVEDQIEAAR (598-611)
<b>Kompleks replikacyjny DNA GINS3 białko PSF3 (GINS3)</b> [GINS3, Q9BRX5] Długość: 216 aa, Masa (Da): 24 535	LGAFFLER (43-50) SAGAETDNAVPOGSK (51-65) LELPLWLAK (66-74) TVFSADPNVVDLHK (98-111) IMDSSQNAYNEDTSALVAR (149-167) GQASQITASNLVQNYK (192-207)
<b>Cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych (EPCAM)</b> [EPCAM, P16422] Długość: 314 aa, Masa (Da): 34 932	LAVNCFVNNNR (34-44) QCQCTSVGAQNTVICSK (45-61) EKPYDSK (154-160) TQNDVDIADVAYFEK (203-218) APEFSMQGLK (256-265)
<b>Enolaza swoista dla neuronów (NSE)</b> [ENO2, P09104] Długość: 434 aa, Masa (Da): 47 269	GNPTVEVDLYTAK (16-28) AVDHINSTIAPALISSGLSVVEQEK (65-89) YITGDQLGALYQDFVR (270-285) IEEELGDEAR (413-422)
<b>Peptyd uwalniający gastrynę GRP (GRP)</b> [GRP, P07492] Długość: 148 aa, Masa (Da): 16 213	AVPLPAGGGTVLTK (23-36) VPLPAGGGTVLTK (24-36) STGESSVSER (54-64) NLLGLIEAK (83-91) NHQPPQPK (95-102) ALGNQQPSWDESSNFK (103-120) LSAPGSQR (131-138)
<b>Receptor czynnika wzrostu hepatocytów (MET)</b> [MET, P08581] Długość: 1,390 aa, Masa (Da): 155 541	EVFNILQAAYVSKPGAQLAR (312-331) GDLTIANLGTSEGR (448-461) LNSELNIEWK (903-912)
<b>Kalikreina 12 (KLK12)</b> [KLK12, Q9UKR0] Długość: 248 aa, Masa (Da): 26 734	NSQPWQVGLFEGTSLR (31-46) LGEHLSQLDWTEQIR (72-87)
<b>Cytokeratyna 14 (CK-14)</b> [KRT14, P02533] Długość: 472 aa, Masa (Da): 51 561	APSTYGGGLSVSSSR (42-56) DAEEWFFTK (301-309)
<b>Cytokeratyna 16 (CK-16)</b> [KRT16, P08779] Długość: 473 aa, Masa (Da): 51 268	APSTYGGGLSVSSSR (42-55) DAETWFLSK (303-311)
<b>Cytokeratyna 17 (CK-17)</b> [KRT17, Q04695] Długość: 432 aa, Masa (Da): 48 106	ALEEANTELEVK (104-115) AAPGVDSLR (243-251) ASLEGNLAETENR (322-334) TIVEEVQDGK (410-419)
<b>Antygen nowotworowy 125 (MUC-16/CA-125)</b> [MUC16, Q8WXI7] Długość: 14 507 aa, Masa (Da): 1 519 175	DSLFINGYAPQNLSIR (14184-14199) ALFSSNLDPSLVEQVFLDK (14266-14284) VAIYEEFLR (14405-14413)
<b>Receptor typu fosfatazy białkowo-tyrozynowej F (PTPRF)</b> [PTPRF, P10586] Długość: 1 907 aa, Masa (Da): 212 879	YSIGGLSPFSEYAFR (374-388) VLAFTAVGDGPPSPTIQVK (488-506) TGEGFIDFIGQVHK (1811-1824)

Figura 9 cd.

<b>Antygen raka płaskonabłonkowego SCC 1 (SPB3/SCCA-1)</b> [SPB3, P29508] Długość: 390 aa, Masa (Da): 44 565	VLHFDQVTENTTGK (56-69) FYQTSVESVDFANAPEESR (126-144) QYTSFHFASLEDVQAK (215-230) GLVLSGVLHK (322-331)
<b>Antygen raka płaskonabłonkowego SCC 2 (SPB4/SCCA-2)</b> [SPB4, P48594] Długość: 390 aa, Masa (Da): 44 854	VLHFDQVTENTTEK (56-69) FYQTSVESTDFANAPEESR (126-144) QYNSFNFALLEDVQAK (215-230) ETCVDLHLPR (277-286)  Peptydy wspólne dla SPB3, SPB4: FMFDLFQQFR SPB3, SPB4 (11-20) STDAYELK SPB3, SPB4 (95-102) INSWVESQTNEK SPB3, SPB4 (147-158) TNSILFYGR SPB3, SPB4 (378-386)
<b>Czynnik koniczynny 3 (TFF3)</b> [TFF3, Q07654] Długość: 94 aa, Masa (Da): 10 181	VDCGYPHVTPK (54-64) GCCFDSR (70-76)
<b>Ludzkie białko z komórek nabłonkowych jądra (WFDC2/HE4)</b> [WFDC2, Q14508] Długość: 124 aa, Masa (Da): 12 993	CCSAGCATFCSLPNDK (61-76) EGSCPQVNIINFPQLGLCR (77-94) DQCQVDSQCPGQMK (95-108)
<b>Deaminaza Adenozyny (ADA1)</b> [ADA, P00813] Długość: 363 aa, Masa (Da): 40 764	VELHVHLDGSIKPETILYYGR (12-32) YSPHLLANSK (102-111) LGHGYHTLEDQALYNR (236-251)
<b>Katepsyna B (CTSB)</b> [CTSB, P07858] Długość: 339 aa, Masa (Da): 37 822	NGPVEGAFSVYSDFLLYK (246-263)
<b>Interferon gamma (IFNG)</b> [IFNG, P01579] Długość: 166 aa, Masa (Da): 19 348	YFNAGHSDVADNGTLFLGILK (37-57) IMQSQIVSFYFK (67-78) LTNYSVTDLNVQR (118-130) AIHELIQVMAELSPAACK (132-148)
<b>Interleukina 33 (IL33)</b> [IL33, O95760] Długość: 270 aa, Masa (Da): 30 759	VLLSYYESQHPSNESGDGVDGK (159-180) DFWLHANNK (191-199) EHSVLEHK (200-207) TDPGVFIGVK (234-243) DNHLALIK (244-251) VDSSENLCTENILFK (252-266)
<b>Perforyna 1 (PRF1)</b> [PRF1, P14222] Długość: 555 aa, Masa (Da): 61 377	FVPGAWLAGEGVDVTSR (37-54) LISNYGTHFIR (215-225) ALSQYLTDK (363-371) LFFGGQELR (441-449) TSTVWDNNNPIWSVR (450-464) LDFGDVLLATGGPLR (465-479)
<b>Członek nadrodziny receptora czynnika martwicy nowotworów 6B (TNFRSF6B)</b> [TNFRSF6B, O95407] Długość: 300 aa, Masa (Da): 32 680	VAETPTYPWK (30-39) LVCAQCPPGTFVQRPCR (47-63) DSPTTCGCPPCR (65-76) VPGAEEKER (205-213) LLQALEAPEGWGPTPR (232-247) LTELLGAQDGALLVR (261-275)
<b>Dehydrogenaza mleczanowa łańcuch C (LDHC)</b> [LDHC, P07864] Długość: 332 aa, Masa (Da): 36 311	LIEDDENSQCK (12-22) DLADELALVDVALDK (43-57) IVIVTAGAR (91-99) SIIPAIVHYSPOCK (119-132) SAETLWNIQK (319-328)



## SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI ZGŁOSZENIA WYNAŁAZKU NR P.440401

Klasyfikacja zgłoszenia: G01N 33/68 (2006.01)		
Poszukiwania prowadzono w klasach: G01N		
Bazy komputerowe, w których prowadzono poszukiwania: Epoquet (Epodoc, Wpi, Embase, Medline, X-full); bazy UPRP, Google		
Kategoria dokumentu	Dokumenty – z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	PL414159 A1; INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, [PL]; 2017-03-27	1-29
A	CN109490556A; BEIJING CHEST HOSPITAL CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY, Beijing [CN] ET AL.; 2019-03-19	1-29
A	CN107064524A; BEIJING CHEST HOSPITAL CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY, Beijing [CN] ET AL.; 2017-08-18	1-29
A	J. M. Porcel et al.: "Biomarkers of infection for the differential diagnosis of pleural effusions", European Respiratory Journal; 2009 34: 1383-1389	1-29
<input type="checkbox"/> Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
<p>A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie;  E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia;  L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu;  O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób;  P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa;  T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku;  X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie;  Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy;  &amp; – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.</p>		

Sprawozdanie wykonała: dr Małgorzata Kozłowska  
Ekspert Koordynator

Data: 28-10-2022 r. podpis:

/-podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/  
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

## Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z dn. 16.02.2022 r.