



**UNIwersYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2022 r.



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Kornel Bielawski

Ocena przydatności oznaczenia heparanazy, wybranych markerów angiogenezy, hemostazy oraz hormonów wydzielanych przez tkankę tłuszczową jako czynników prognostycznych w grupie pacjentek z rozpoznaniem pierwotnym nowotworem piersi.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

Dr hab. n. med. Barbara Ruszkowska-Ciastek, prof. UMK

Bydgoszcz 2022 r.

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi dr hab.
n. med. Barbarze Ruszkowskiej-Ciastek, prof. UMK za
cierpliwość, życzliwość i poświęcony mi czas, a także za
udzielone wsparcie merytoryczne.*

Spis treści

Wykaz skrótów	7
I. Wstęp	9
1. Nowotwór piersi	9
1.1. Budowa gruczołu piersiowego	9
1.2. Etiopatogeneza	10
1.3. Epidemiologia	13
1.3.1. Zachorowalność	14
1.3.2. Śmiertelność	14
1.4. Czynniki ryzyka wystąpienia nowotworu piersi	15
1.5. Klasyfikacja raka piersi	17
1.5.1. Klasyfikacja histologiczna	17
1.5.2. Klasyfikacja molekularna	19
1.5.3. Klasyfikacja TNM	20
1.5.4. Klasyfikacja stopnia złośliwości histologicznej Elston-Ellis	22
1.6. Leczenie raka piersi	23
1.6.1. Terapia neoadjuwantowa	24
1.6.2. Terapia adjuwantowa	25
1.6.3. Rodzaje leczenia chirurgicznego raka piersi	26
1.6.4. Hormonoterapia w raku piersi	28
1.6.5. Chemioterapia w raku piersi	29
1.6.6. Radioterapia w raku piersi	30
1.6.7. Immunoterapia w raku piersi	30
2. Mikrośrodowisko nowotworowe	31
2.1. Stan zapalny	33
2.1.1. Makrofagi związane z guzem	34

2.1.2. Stan zapalny związany z tkanką tłuszczową	35
2.2. Neowaskularyzacja	39
2.2.1. Angiogeneza	40
2.2.2. Waskulogeneza	44
2.3. Stan prozakrzepowy	46
2.4. Macierz zewnątrzkomórkowa	48
2.4.1. Budowa macierzy zewnątrzkomórkowej	49
2.4.2. Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej	51
3. Heparanaza	52
3.1. Budowa heparanazy	53
3.2. Aktywność enzymatyczna	53
3.3. Aktywność nieenzymatyczna	55
3.4. Udział heparanazy w procesach fizjologicznych	57
3.5. Udział heparanazy w stanach patologicznych	58
3.6. Heparanaza w nowotworach	59
3.6.1. Działanie przeciwnowotworowe heparanazy	60
3.6.2. Działanie pronowotworowe heparanazy	62
3.7. Heparanaza w innych nowotworach	63
3.8. Heparanaza w raku piersi	64
II. CEL	66
III. MONOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI	67
IV. PODSUMOWANIE.....	130
V. WNIOSKI	132
VI. STRESZCZENIA	134
VII. BIBLIOGRAFIA	140
VIII. SPIS RYCIN.....	147

IX. SPIS TABEL.....	149
X. OŚWIADCZENIA	150

Wykaz skrótów

ACS	Amerykańskie Towarzystwo Onkologiczne (ang. American Cancer Society)
ADAMs	adamalizyny (ang. adamalysins)
AIs	inhibitory aromatazy (ang. aromatase inhibitors)
AJCC	Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka (ang. American Joint Committee on Cancer)
BCS	operacja oszczędzająca pierś (ang. breast-conserving surgery)
bFGF	zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growth factor)
BMI	indeks masy ciała (ang. body mass index)
CAAs	adipocyty związane z rakiem (ang. cancer-associated adipocytes)
CAR-T	limfocyty T zawierające chimeryczny receptor antygenowy (ang. chimeric antigen receptors T cells)
COX-2	cyklooksigenaza 2 (ang. cyclooxygenase 2)
CTCs	krążące komórki nowotworowe (ang. circulating tumor cells)
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix)
ECs	komórki śródbłónka (ang. endothelial cells)
EGF	epidermalny czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
EPCs	komórki progenitorowe śródbłónka (ang. endothelial progenitor cells)
EPO	erytropoetyna (ang. erythropoietin)
ER	receptor estrogenowy (ang. estrogen receptor)
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
HER2	ludzki naskórkowy czynnik wzrostu 2 (ang. human epidermal growth factor receptor 2)
HGF	czynnik wzrostu hepatocytów (ang. hepatocyte growth factor)
HS	siarczan heparanu (ang. heparan sulfate)
HSPG	proteoglikan siarczanu heparanu (ang. heparan sulfate proteoglycan)
IDC-NST	inwazyjny rak przewodowy bez specjalnego typu (ang. invasive ductal carcinoma - no special type)
IFN γ	interferon γ (ang. interferon gamma)
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. insulin-like growth factor 1)

IL-1	interleukina 1 (ang. interleukin 1)
IL-6	interleukina 6 (ang. interleukin 6)
IL-8	interleukina 8 (ang. interleukin 8)
IL-10	interleukina 10 (ang. interleukin 10)
IL-18	interleukina 18 (ang. interleukin 18)
ILC	inwazyjny rak zrazikowy (ang. invasive lobular carcinoma)
MMPs	metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. matrix metalloproteinases)
NF- κ B	NF kappa B (ang. nuclear factor kappa B)
NK	komórki NK (ang. natural killer cells)
PF-4	czynnik płytkowy 4 (ang. platelet factor 4)
PGF	łożyskowy czynnik wzrostu (ang. placental growth factor)
PR	receptor progesteronowy (ang. progesterone receptor)
RAA	układ renina-angiotensyna-aldosteron (ang. renin-angiotensin-aldosterone system)
RANK	aktywator receptora czynnika jądrowego κ B (ang. receptor activator of nuclear factor κ B)
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
SDF-1	czynnik pochodzenia zrębowego 1 (ang. stromal cell-derived factor 1)
SERDs	selektywne degradatory receptora estrogenowego (ang. selective estrogen receptor degraders)
SERMs	selektywne modulatory receptora estrogenowego (ang. selective estrogen receptor modulators)
TAMs	makrofagi związane z nowotworem (ang. tumor-associated macrophages)
TF	czynnik tkankowy (ang. tissue factor)
TIMPs	tkankowe inhibitory metaloproteinaz (ang. tissue inhibitors of metalloproteinases)
TNF- α	czynnik martwicy nowotworu α (ang. tumor necrosis factor alfa)
VEGF	naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. vascular endothelial growth factor)
VEGFR-1	receptor dla VEGF typu 1 (ang. vascular endothelial growth factor receptor type 1)
VEGFR-2	receptor dla VEGF typu 2 (ang. vascular endothelial growth factor receptor type 2)
vWF	czynnik von Willebranda (ang. von Willebrand factor)
WAT	biała tkanka tłuszczowa (ang. white adipose tissue)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

I. Wstęp

1. Nowotwór piersi

Rak piersi jest jednym z trzech najczęstszych nowotworów na świecie [1]. Wśród kobiet jest to zarówno głównie występujący nowotwór jak i najważniejsza przyczyna śmierci związana z chorobą nowotworową [2]. Rak piersi występuje również wśród mężczyzn jednak odsetek zachorowań jest niepomiaralnie mniejszy niż w populacji kobiet (ok. 1%) [3] i co ciekawe wiąże się ze znacząco gorszym rokowaniem [4].

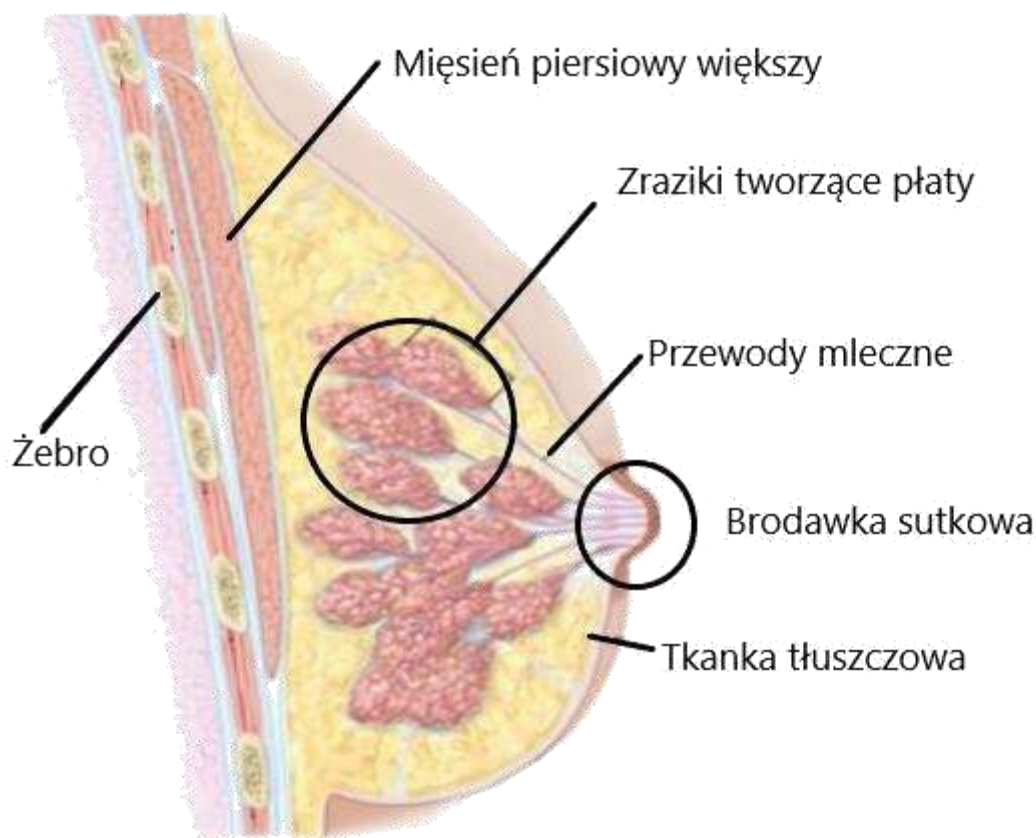
Rozwój nowotworu piersi związany jest najczęściej z czynnikami hormonalnymi, środowiskowymi oraz stylem życia. Czynniki genetyczne takie jak dziedziczenie mutacji, odgrywają kluczową rolę w ok. 10% przypadków raka piersi [5]. Nie mniej zaleca się identyfikację kobiet zagrożonych przede wszystkim mutacjami w genach BRCA1 i BRCA2 [2].

Biorąc pod uwagę cechy kliniczno-patologiczne rak piersi stanowi wysoce niejednorodną grupę nowotworów. Wyróżniamy przypadki charakteryzujące się powolnym wzrostem guza nowotworowego oraz korzystnym rokowaniem, jak również nowotwory o bardzo agresywnym przebiegu i wysokiej śmiertelności [6].

W zależności od rodzaju nowotworu piersi stosuje się różne typy leczenia takie jak zabieg chirurgiczny, hormonoterapię, radioterapię, chemioterapię oraz immunoterapię [1, 7]. W ostatnich latach wśród pacjentek, u których zdiagnozowano nowotwór piersi głównym celem terapii stało się unikanie zarówno niedostatecznego jak i nadmiernego leczenia, co ma ścisły związek z wdrażaniem spersonalizowanej terapii [1].

1.1. Budowa gruczołu piersiowego

Kobiecy gruczoł piersiowy, zbudowany jest z przewodów mlecznych oraz około 12-20 płatów, które są dalej podzielone na mniejsze zraziki – Rycina 1. Oprócz tkanki gruczołowej kobiece piersi zawierają również tkankę tłuszczową, tkankę łączną oraz kilka włókien mięśni gładkich. Całość otoczona jest przez sieć nerwów, naczyń krwionośnych, naczyń limfatycznych i węzłów chłonnych. Piersi będące narządem gruczołowym, są bardzo wrażliwe na zmiany hormonalne obserwowane w każdym cyklu menstruacyjnym oraz podczas ciąży. Dodatkowo w dojrzałej tkance występują komórki prekursorowe, które są w stanie syntetyzować nowe jednostki kanałowo-zrazikowe [7, 8].



Rycina 1. Budowa gruczołu piersiowego w modyfikacji własnej [8].

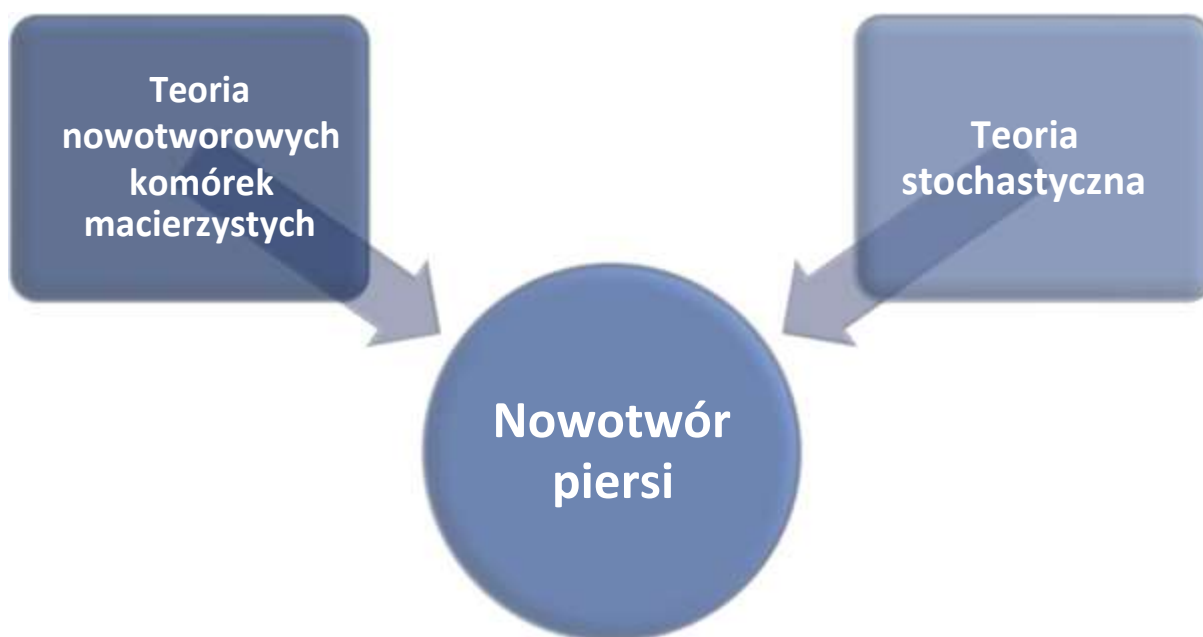
1.2. Etiopatogeneza

Najczęściej hiperprolifercja przewodowa i następująca po niej stymulacja czynnikami kancerogennymi zapoczątkowują rozwój nowotworu piersi [9]. Prawidłowe komórki mają ograniczoną regulację wzrostu i różnicowania w celu zachowania prawidłowej struktury oraz funkcji. Natomiast komórki nowotworowe charakteryzują się przedłużoną i niekontrolowaną proliferacją bez konieczności udziału bodźców zewnętrznych [10]. Może to wynikać z wystąpienia mutacji w genach zaangażowanych w kodowanie szlaków ochronnych RAS/MEK/ERK i PI3K/AKT. Mutacje te powodują niezdolność do przechodzenia przez komórkę na szlak programowanej śmierci i tym samym prowadzą do transformacji nowotworowej [7].

Na występowanie raka piersi wpływ mają zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe [7]. Większość nowotworów piersi rozwija się w wyniku mutacji somatycznych o charakterze sporadycznym, powstałych w ciągu życia. Pozostałe przypadki nowotworu piersi to pacjenci ze znaną dziedziczną mutacją, do których należą przede wszystkim mutacje w genach zaangażowanych w naprawę DNA takich jak BRCA1 i BRCA2 oraz

rzadziej występujące mutacje w genach p53, PTEN, CDH1, STK11, PALB2, CHECK2, ATM i NF1 [10]. W związku z tym istnieją dowody na to, iż zastosowanie profilowania ekspresji genów występujących w raku piersi może być silniejszym oraz lepszym wskaźnikiem prognostycznym niż tradycyjne determinanty, takie jak rozmiar guza i status zajęcia węzłów chłonnych [11].

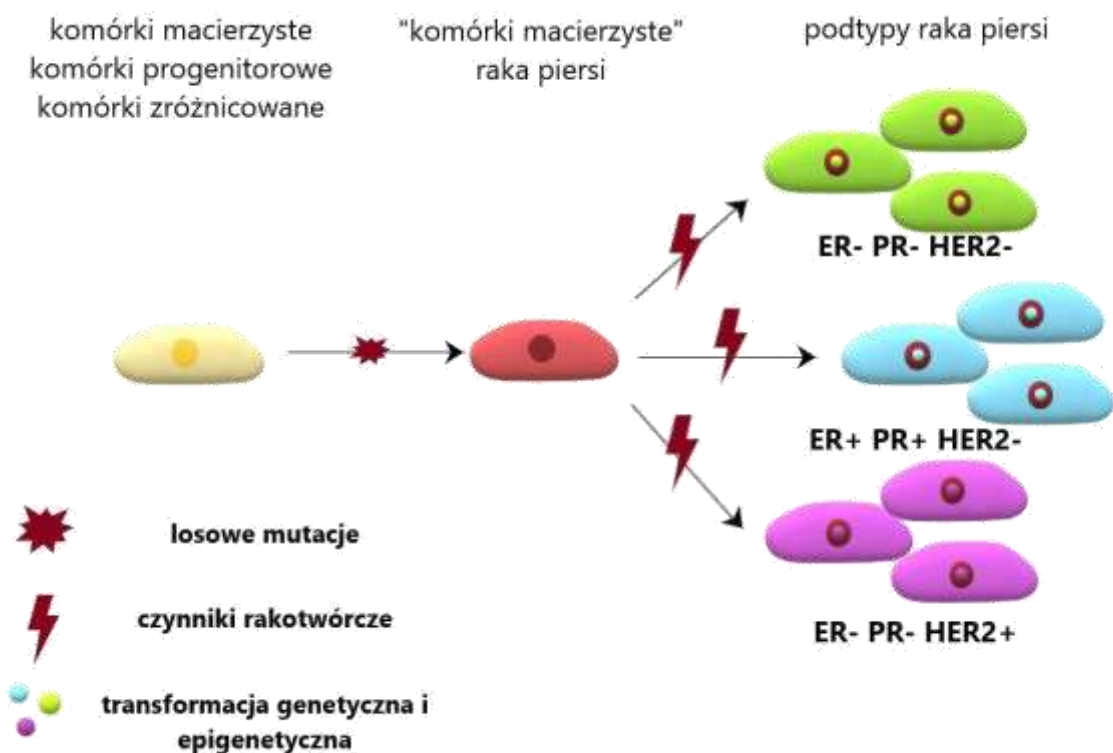
Istnieją dwie hipotetyczne teorie dotyczące inicjacji i progresji raka piersi: teoria nowotworowych komórek macierzystych i teoria stochastyczna – Rycina 2 [9].



Rycina 2. Teorie powstawania nowotworów piersi (rycina własna) [9].

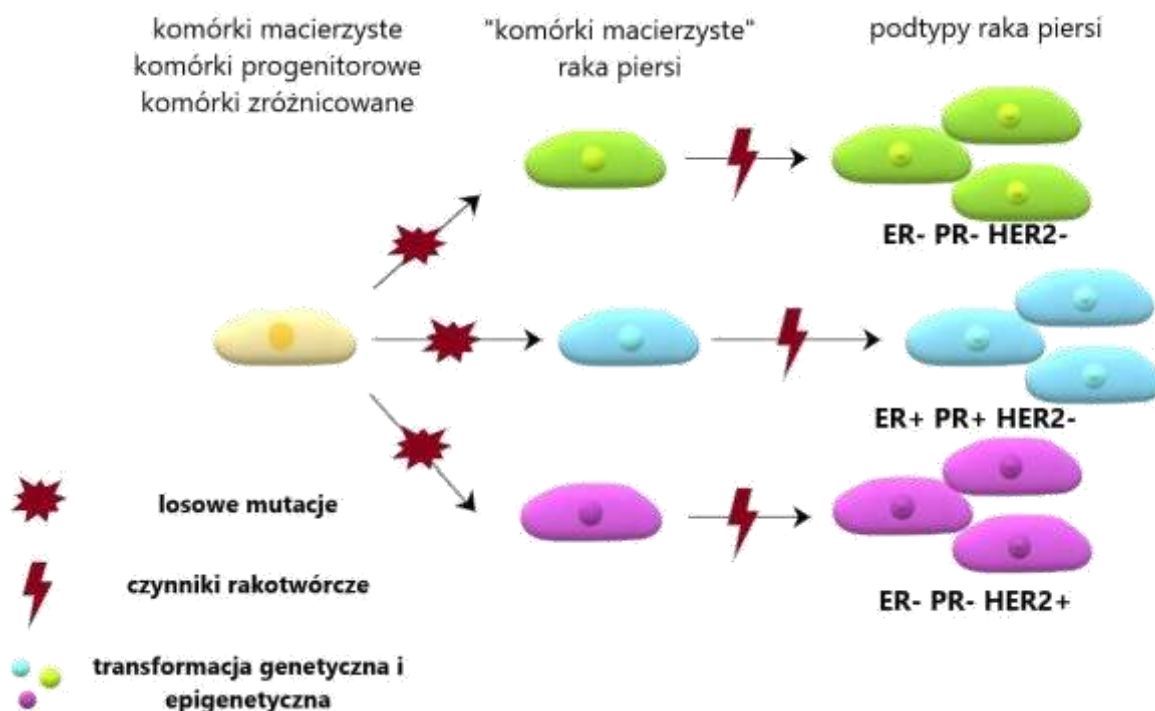
W odniesieniu do karcynogenezy i progresji nowotworu teoria komórek progenitorowych/macierzystych jest sprzeczna z tradycyjnym podejściem stochastycznym. Zgodnie z tradycyjnym podejściem rokowanie jest podyktowane faktyczną liczbą inwazyjnych lub przerzutowych komórek nowotworowych, dlatego celem interwencji terapeutycznych jest ograniczenie tej liczby do minimum. Teoria komórek progenitorowych/macierzystych przewiduje, że tylko niektóre (i prawdopodobnie mniejszość) komórek nowotworowych są faktycznie odpowiedzialne za progresję guza i późniejsze wyniki kliniczne, a leczenie powinno być ukierunkowane tylko na te komórki [11].

Teoria komórek macierzystych raka sugeruje także, że wszystkie podtypy nowotworów pochodzą z tych samych komórek macierzystych lub komórek progenitorowych. Nabyte mutacje genetyczne i epigenetyczne w komórkach macierzystych lub komórkach progenitorowych prowadzą do różnych fenotypów guza – Rycina 3 [9].



Rycina 3. Pochodzenie podtypów nowotworów piersi na podstawie teorii komórek macierzystych w modyfikacji własnej [9].

Natomiast zgodnie z teorią stochastyczną każdy podtyp nowotworu piersi jest zapoczątkowany przez pojedynczy typ komórki (komórka macierzysta, komórka progenitorowa lub komórka zróżnicowana) – Rycina 4. Losowe mutacje mogą stopniowo gromadzić się w dowolnych komórkach piersi, a gdy skumuluje się odpowiednia ilość mutacji prowadzą do transformacji komórek zdrowych w nowotworowe. Chociaż obie teorie są poparte wieloma danymi, żadna z nich nie jest w stanie w pełni wyjaśnić patogenezy nowotworu piersi. Dlatego dalsze badania w tym zakresie są konieczne [9].



Rycina 4. Pochodzenie podtypów nowotworów piersi na podstawie teorii stochastycznej w modyfikacji własnej [9].

1.3. Epidemiologia

Aktualne prognozy i statystyki wskazują na globalny trend wzrostu zarówno zachorowalności na raka piersi, jak i związanej z nim śmiertelności [6]. W 2020 r. na całym świecie zdiagnozowano raka piersi u ok. 2,3 miliona kobiet oraz odnotowano ok. 685 tys. zgonów z tego powodu [12].

Kwestie społeczno-ekonomiczne określa się mianem niezwykle istotnych w kontekście odwrócenia światowego trendu wzrostu zachorowalności i śmiertelności z powodu raka piersi [6]. Dostępne statystyki sugerują, że wskaźniki zachorowalności i śmiertelności w krajach wysoko rozwiniętych obniżają się, podczas gdy w krajach rozwijających się wskaźniki te rosną. Różnice te mogą wynikać ze zmieniającego się profilu czynników ryzyka oraz dysproporcji w dostępie zarówno do badań przesiewowych jak i nowoczesnych terapii czy metod diagnostycznych stosowanych w leczeniu nowotworu piersi [2]. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization) wczesne wykrywanie raka piersi stanowi podstawę poprawy wyników leczenia oraz całkowitego przeżycia [7].

1.3.1. Zachorowalność

Globalnie nowotwór piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem wśród kobiet. W 2020 roku nowotwór ten był najczęściej diagnozowanym nowotworem u kobiet w 158 krajach świata. W Tabeli 1 przedstawiono szacowane dane WHO dotyczące zachorowalności na raka piersi w 2020 roku w Polsce, Europie oraz na Świecie [12].

Dodatkowo warto zwrócić uwagę na systematyczny wzrost zachorowalność na raka piersi w Polsce. Na podstawie danych Krajowego Rejestru Nowotworów w 1999 roku w Polsce zdiagnozowano 10 903 nowe przypadki nowotworu piersi, natomiast w 2018 roku liczba nowo rozpoznanych pacjentek z nowotworem piersi wzrosła o około 73% i wyniosła 18 869 przypadków [13], a w 2020 było to już 24 644 pacjentek [12].

Tabela 1. Szacowana zachorowalność na raka piersi oraz nowotwory wśród kobiet w 2020 roku na podstawie danych WHO [12].

Region	Zachorowalność na raka piersi	Zachorowalność		Zachorowalność
		na raka piersi na 100 tys. mieszkańców	Zachorowalność na nowotwory	na nowotwory na 100 tys. mieszkańców
Polska	24 644	68,7	101 807	249,6
Europa	531 086	74,3	2 058 826	256,4
Świat	2 261 419	47,8	9 227 484	186,0

1.3.2. Śmiertelność

Rak piersi w 2020 roku w 108 krajach świata stanowił najczęstszą przyczynę śmierci kobiet z powodu choroby nowotworowej. Dlatego też został uznany za główną światową przyczynę śmierci z przyczyn nowotworowych w tej grupie. Tabela 2 zawiera szacowane dane WHO dotyczące śmiertelności z powodu raka piersi w 2020 r. na obszarze Polski, Europy oraz Świata [12].

W Polsce obserwujemy również wzrost śmiertelności spowodowanej rakiem piersi. Z danych Krajowego Rejestru Nowotworów wynika, że pomiędzy rokiem 1999 a 2018 w Polsce odnotowano wzrost o 51% liczby zgonów z powodu nowotworu piersi. Liczba śmiertelnych

przypadków wynosiła odpowiednio 4 553 oraz 6 895 [13], a w 2020 roku było to aż 8 805 kobiet [12].

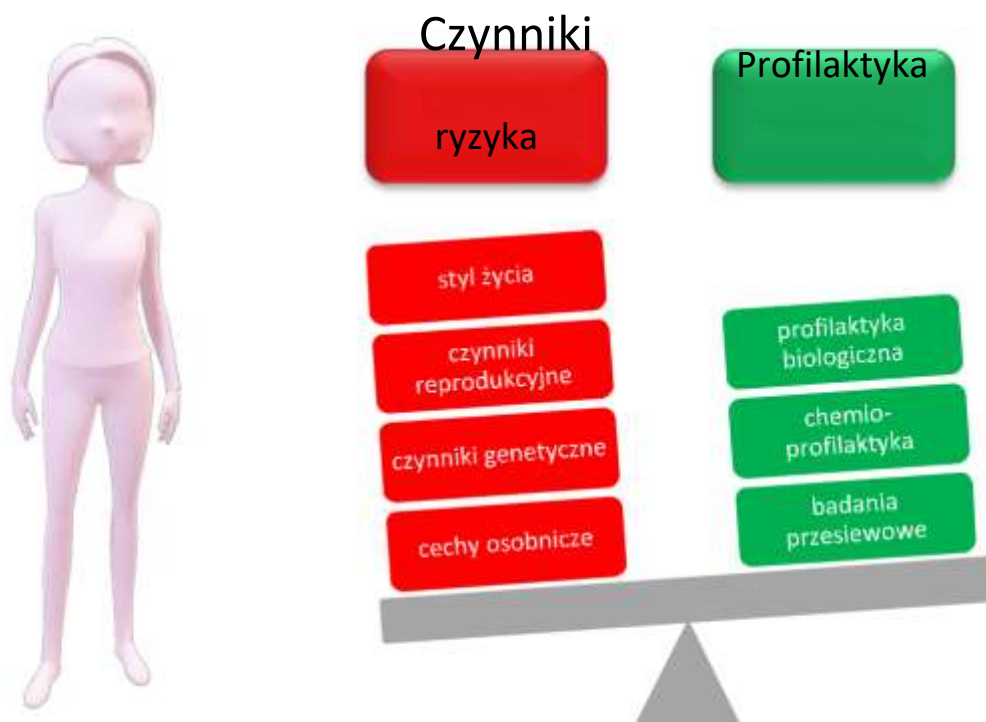
Tabela 2. Szacowana śmiertelność na raka piersi oraz nowotwory wśród kobiet w 2020 roku na podstawie danych WHO [12].

Region	Śmiertelność na raka piersi	Śmiertelność na		Śmiertelność na nowotwory na 100 tys. mieszkańców
		raka piersi na 100 tys. mieszkańców	nowotwory	
Polska	8 805	17,9	54 074	108,2
Europa	141 765	14,8	871 206	85,2
Świat	684 996	13,6	4 429 323	84,2

1.4. Czynniki ryzyka wystąpienia nowotworu piersi

Rak piersi w 90% przypadków jest związany z czynnikami środowiskowymi, reprodukcyjnymi i stylem życia. Niektóre z nich należą do potencjalnie modyfikowalnych [5]. W tym kontekście istotne wydają się być aktualnie stosowane, bardziej bezpośrednio i skuteczne niż stosowane w przeszłości, metody profilaktyki takie jak badania przesiewowe, chemoprewencja, czy profilaktyka biologiczna [9]. Wystąpienie nowotworu piersi jest związane z zaburzeniem równowagi pomiędzy czynnikami ryzyka a stosowanymi działaniami z zakresu profilaktyki – Rycina 5.

Obserwowane różnice we wzorcach zachorowalności na nowotwór piersi w różnych krajach są determinowane również przez czynniki kulturowe oraz ogólnokrajowe kampanie informacyjno-profilaktyczne. Przykładem może być globalny wzrost zachorowalności na raka piersi obserwowany pomiędzy 1980 r. a 2000 r. Prawdopodobnie jego przyczyną były zmiany związane z czynnikami reprodukcyjnymi takie jak późniejszy wiek pierwszej ciąży, a także wzrost świadomości i związany z tym wzrost liczby wykonywanych przesiewowych badań mammograficznych [14].



Rycina 5. Czynniki wpływające na wystąpienie raka piersi na podstawie Sun i wsp. [9].

Szacuje się, że około 20% przypadków nowotworu piersi na całym świecie można przypisać modyfikowalnym czynnikom ryzyka, w szczególności stylowi życia i wynikającej z niego nadwadze lub otyłości [14]. Znajomość czynników ryzyka związanych ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na nowotwór piersi pozwala na określenie najbardziej narażonych grup, w których działania profilaktyczne mogą nieść najwięcej korzyści – Tabela 3.

Tabela 3. Wybrane czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi w modyfikacji własnej [15].

Kategoria	Czynnik	Zwiększone ryzyko gdy:
Cechy osobnicze	Wiek	Powyżej 50 lat
	Płeć	Kobieta
Czynniki genetyczne	Gen BRCA1/BRCA2	Występowanie mutacji
	Wywiad rodzinny	Rak piersi u krewnego pierwszego stopnia
Styl życia	Spożycie alkoholu	Nadmierne
	Dieta	Bogata w nasycone kwasy tłuszczowe
	BMI	Powyżej 35 kg/m ²

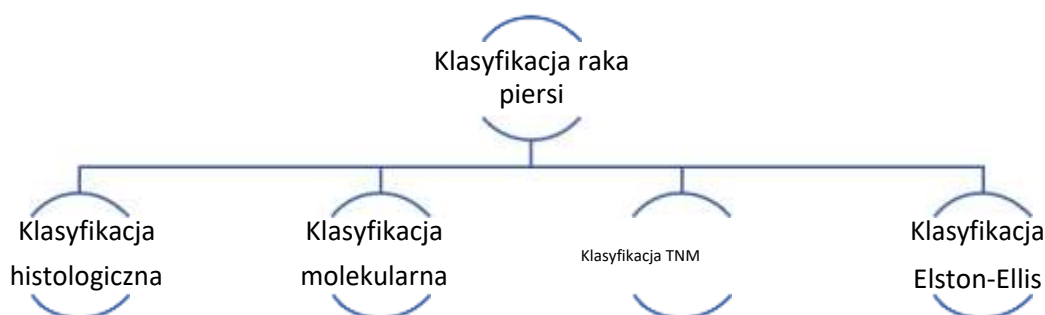
Czynniki środowiskowe	Miejsce zamieszkania	Kraje rozwinięte
	Promieniowanie jonizujące	Ekspozycja w młodym wieku
Czynniki reprodukcyjne	Pierwsza miesiączka	Przed 11 rokiem życia
	Pierwsza ciąża	Po 40 roku życia
	Menopauza	Po 54 roku życia
	Hormonalna terapia wieku menopauzalnego	Ponad 10 lat stosowania

BMI – indeks masy ciała, ang. body mass index

1.5. Klasyfikacja raka piersi

Rak piersi obejmuje niejednorodny zbiór nowotworów o różnych cechach morfologicznych, fenotypowych i molekularnych. Rycina 6 przedstawia najczęściej stosowane w praktyce onkologicznej klasyfikacje nowotworu piersi.

W zależności od charakterystyki danego guza stwierdzana jest zróżnicowana odpowiedź na leczenie oraz możliwe jest określenie prawdopodobieństwa nawrotu i przewidywanego całkowitego czasu przeżycia [16].

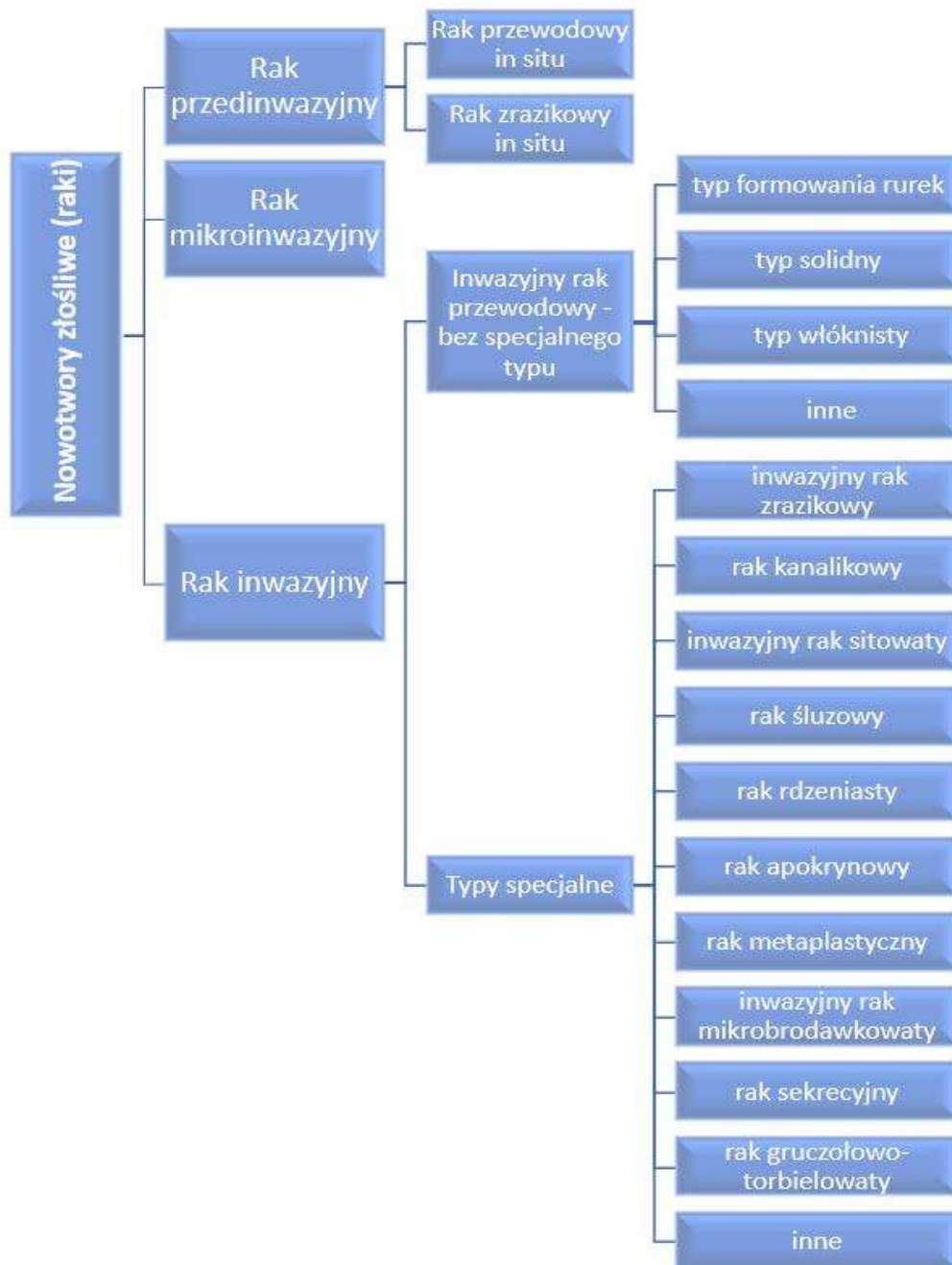


Rycina 6. Aktualnie stosowane klasyfikacje raka piersi [16].

1.5.1. Klasyfikacja histologiczna

Złotym standardem diagnozowania raka piersi jest określenie typu histologicznego komórek nowotworowych. Ocenie poddaje się zarówno architekturę komórek nowotworowych jak i komórkowy wzorzec wzrostu. Na tej podstawie rak piersi może zostać podzielony na trzy podstawowe typy: rak przedinwazyjny, rak mikroinwazyjny oraz rak inwazyjny – Rycina 7 [17]. Inwazyjne typy raka piersi charakteryzują się przechodzeniem komórek nowotworowych przez błonę podstawną i naciekaniem otaczających tkanek [16].

Wśród inwazyjnych raków piersi istnieje ponad 20 różnych podtypów histologicznych. Najczęstszym jest inwazyjny rak przewodowy bez specjalnego typu (IDC-NST, ang. invasive ductal carcinoma - no special type), nie wykazujący żadnych specyficznych cech morfologicznych. Dotyczy ponad 70% wszystkich nowotworów inwazyjnych. Natomiast inwazyjny rak zrazikowy (ILC, ang. invasive lobular carcinoma) stanowi około 10% wszystkich nowotworów inwazyjnych. Pozostałe to mniej powszechne typy histologiczne, takie jak rak śluzowy, sitowaty, mikrobrodawkowaty, brodawkowaty, cewkowy, rdzeniasty, metaplastyczny i apokrynowy [18].

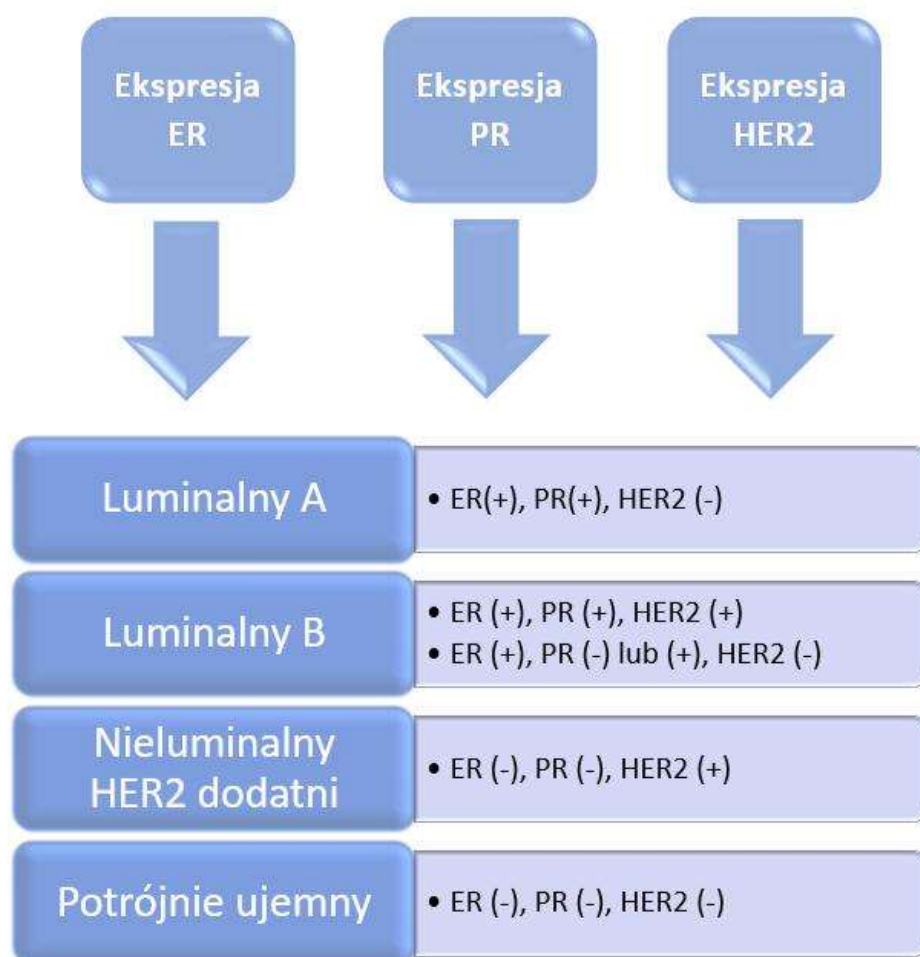


Rycina 7. Histologiczna klasyfikacja raka piersi na podstawie Cserni [17].

1.5.2. Klasyfikacja molekularna

Ocena ekspresji receptora estrogenowego (ER, ang. estrogen receptor), receptora progesteronowego (PR, ang. progesterone receptor) oraz ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2, ang. human epidermal growth factor receptor 2) jest rutynowym postępowaniem w diagnozowaniu i leczeniu raka piersi. ER i PR to receptory jądrowe steroidów płciowych odpowiedzialnych za stymulację wzrostu zarówno prawidłowego jak i zmienionego nowotworowo nabłonka piersi. Ich ekspresja występuje w około 75% wszystkich nowotworów piersi i jest ściśle związana ze skutecznością oraz zasadnością zastosowania terapii hormonalnej [18].

Na podstawie immunohistochemicznej oceny ekspresji ER, PR, HER2, nowotwór piersi został podzielony na 4 podstawowe podtypy molekularne: luminalny A, luminalny B, Nieluminalny HER2 dodatni oraz typ potrójnie ujemny – Rycina 8 [19].



Rycina 8. Podtypy molekularne nowotworu piersi ze względu na ekspresję wybranych markerów [19].

Typ luminalny A jest najczęstszym podtypem molekularnym, reprezentującym 40%-50% inwazyjnych raków piersi. Charakteryzuje się niskim stopniem złośliwości, z najlepszym rokowaniem wśród wszystkich podtypów molekularnych [18].

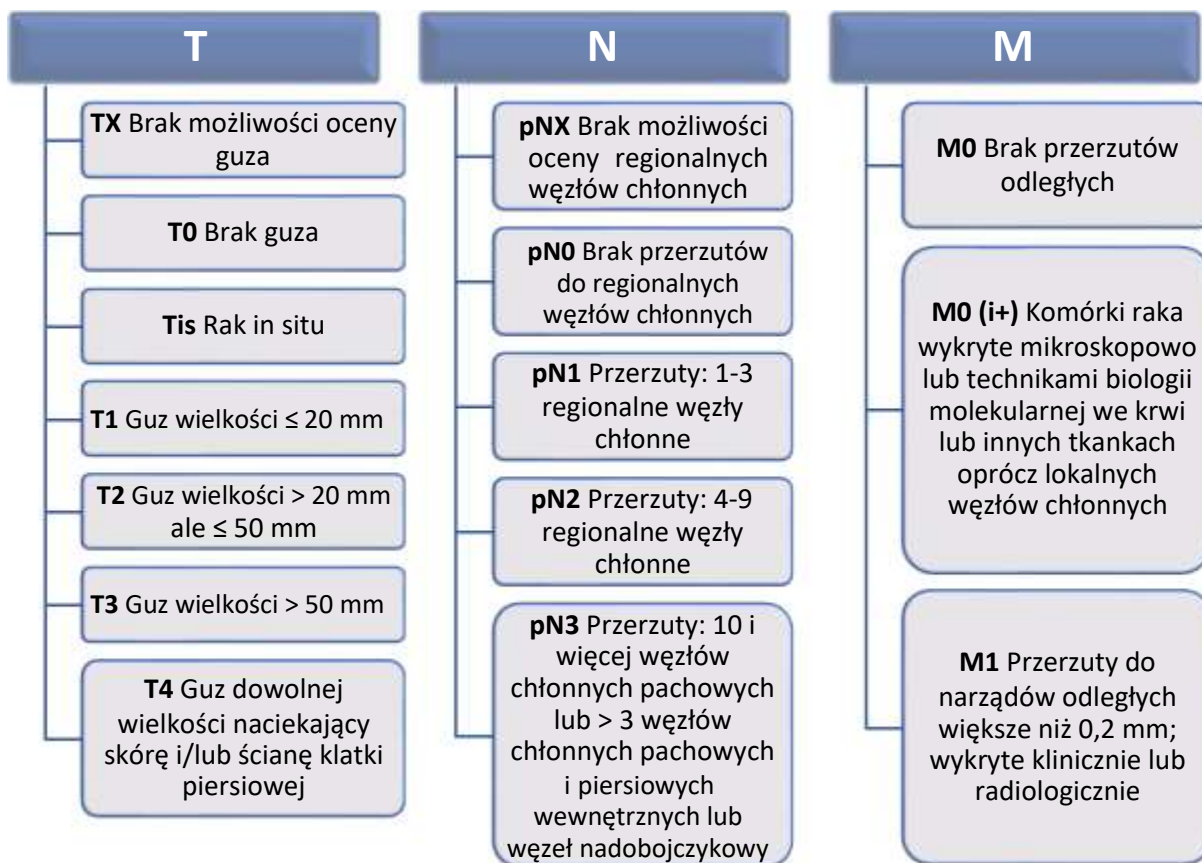
Nowotwory luminalne B stanowiące około 20-30% raków piersi mają tendencję do wyższego stopnia zaawansowania i mają gorsze rokowanie niż raki luminalne A. Wykazują niższą ekspresję genów związanych z ER, ale wyższą ekspresję genów związanych z proliferacją oraz zmienną ekspresję genów związanych z HER2 niż nowotwory luminalne A [18].

Podtyp Nieluminalny z nadekspresją HER2 obejmuje 12-20% wszystkich inwazyjnych raków piersi. Charakteryzuje się wysokim stopniem złośliwości i wiąże się z agresywnym przebiegiem klinicznym. Jednak warto zwrócić uwagę, że jest to podtyp bardzo wrażliwy na immunoterapię ukierunkowaną na komórki z ekspresją HER2, co skutkuje znacznie lepszym całkowitym przeżyciem pacjentek [18].

Podtyp potrójnie ujemny nowotworu piersi występujący w 15-20% przypadków wykazuje nadekspresję genów związanych z proliferacją, innych niż geny związane z ER, PR i HER2. Histologicznie zwykle są to guzy wysokiego stopnia złośliwości, z wysokim wskaźnikiem proliferacji. Pacjenci mają złe rokowanie, a nawroty mogą wystąpić w okresie 2-5 lat od rozpoznania [18].

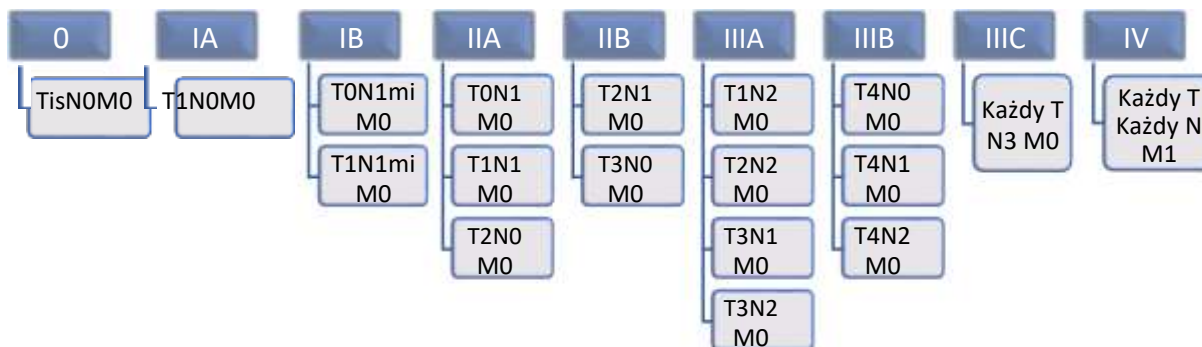
1.5.3. Klasyfikacja TNM

Ocena stopnia zaawansowania klinicznego TNM, opublikowana przez Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka (AJCC, ang. American Joint Committee on Cancer), wykorzystuje zarówno informacje kliniczne, jak i patologiczne takie jak: wielkość guza (T), status zajęcia regionalnych węzłów chłonnych (N) oraz obecność przerzutów odległych (M) – Rycina 9 [18, 20].



Rycina 9. Klasyfikacja wielkości guza pierwotnego (T), statusu zajęcia regionalnych węzłów chłonnych (N) oraz obecności przerzutów odległych (M) w raku piersi na podstawie Giuliano i wsp. [20].

Klasyfikacja stopnia zaawansowania raka piersi wg klasyfikacji TNM łączy te trzy parametry i pozwala określić jeden z 5 podstawowych stadiów choroby (0, I, II, III i IV) – Rycina 10 [18, 20].



Rycina 10. Klasyfikacja stopnia zaawansowania klinicznego raka piersi wg klasyfikacji TNM na podstawie Giuliano i wsp. [20].

Dodatkowo w VIII. wydaniu klasyfikacji TNM sporządzonym przez AJCC informacje o stopniu zaawansowania zostały połączone z istotnymi informacjami dotyczącymi biologicznej natury guza (status ER, PR i HER2) w celu przypisania stopnia zaawansowania prognostycznego. Klasyfikacja prognostyczna pozwala ominąć ograniczenia związane z oceną jedynie anatomicznego zakresu choroby i dostarcza dokładniejszych informacji prognostycznych niż poprzednie systemy klasyfikacji [18, 21]. W Tabeli 4 przedstawiono przykłady różnic pomiędzy stopniem zaawansowania wg klasyfikacji TNM a stopniem zaawansowania prognostycznego.

Tabela 4. Przykładowe różnice pomiędzy stopniem zaawansowania wg klasyfikacji TNM a stopniem zaawansowania prognostycznego w zależności od statusu markerów molekularnych na podstawie Kalli i wsp. [21].

Klasyfikacja TNM	Markery molekularne	Stopień zaawansowania	Stopień zaawansowania prognostycznego
T2N1M0	ER (+), PR (+), HER2 (+)	IIB	IB
T2N1M0	ER (-), PR (-), HER2 (-)	IIB	IIIB
T3N0M0	ER (+), PR (+), HER2 (+)	IIB	IB
T3N0M0	ER (-), PR (-), HER2 (-)	IIB	IIIB
T3N2M0	ER (+), PR (+), HER2 (+ lub -)	IIIA	IIA

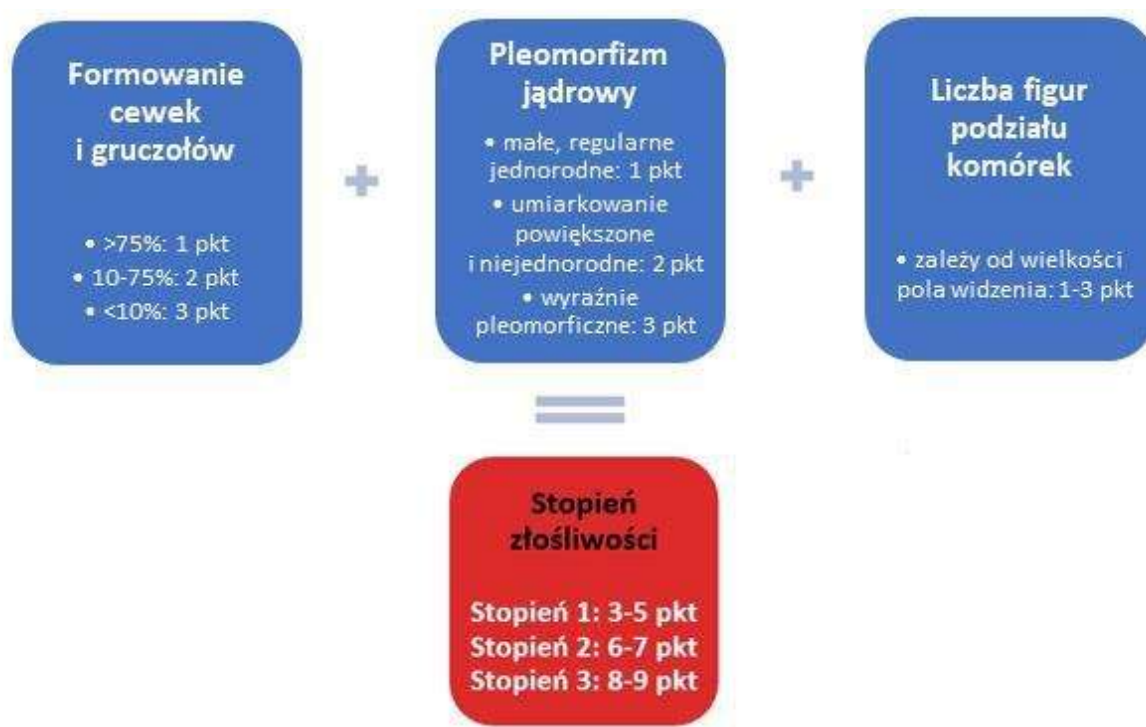
ER – receptor estrogenowy, ang. estrogen receptor; PR – receptor progesteronowy, ang. progesterone receptor; HER2 – ludzki naskórkowy czynnik wzrostu 2, ang. human epidermal growth factor receptor 2; T2 – guz wielkości > 20 mm oraz ≤ 50 mm; T3 – guz wielkości > 50 mm; N1 – przerzuty do 1-3 regionalnych węzłów chłonnych; N2 – przerzuty do 4-9 regionalnych węzłów chłonnych; M0 – brak przerzutów odległych.

1.5.4. Klasyfikacja stopnia złośliwości histologicznej Elston-Ellis

Określenie stopnia złośliwości histologicznej opiera się na mikroskopowej ocenie zróżnicowania tkanki guza. W raku piersi jest to prosta, niedroga, dokładna i poddana walidacji metoda służąca do oceny rokowania oraz podejmowania decyzji terapeutycznych. Dlatego w tych częściach świata, w których ograniczony jest dostęp do nowych technologii stanowi zatwierdzoną alternatywę dla testów molekularnych. Klasyfikacja ta opiera się na ocenie

trzech cech morfologicznych: stopnia uformowania kanalików lub gruczołów, pleomorfizmu jądrowego oraz wskaźnika mitotycznego [22].

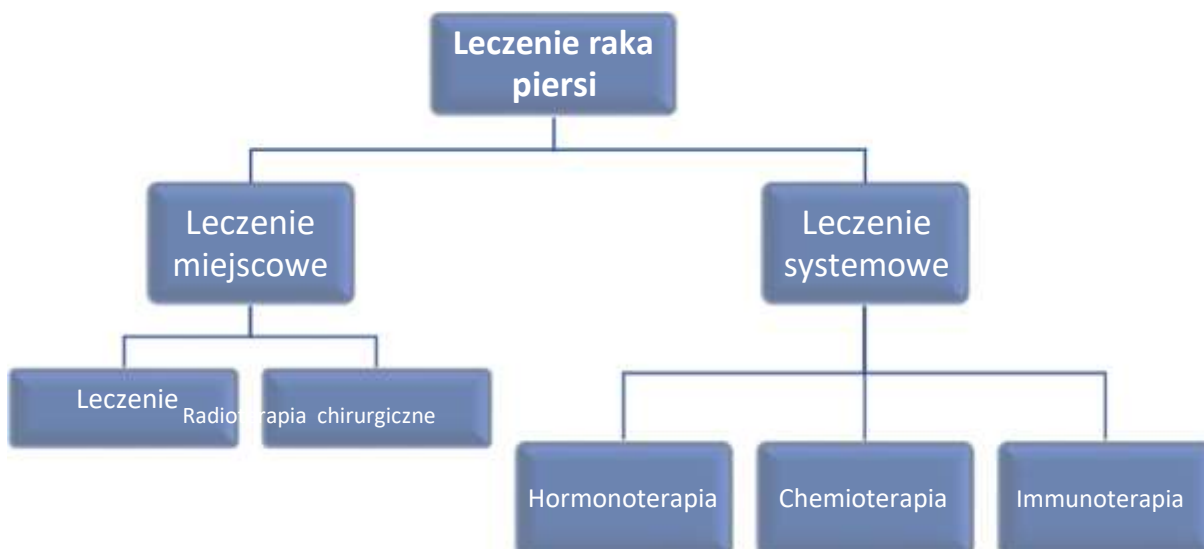
Obecnie WHO i AJCC zalecają ocenę stopnia złośliwości histologicznej wyłącznie na postawie klasyfikacji Blooma-Richardsona-Scarffa w modyfikacji Elstona i Ellisa [22, 23]. Klasyfikacja ta ocenia każdy z trzech parametrów za pomocą liczbowego systemu punktacji od 1 do 3, a wynik sumaryczny pozwala na określenie jednego z trzech stopni złośliwości histologicznej – Rycina 11 [23].



Rycina 11. Klasyfikacja stopnia złośliwości histologicznej raka piersi w modyfikacji Elston-Ellis na podstawie Jassem i wsp. [23].

1.6. Leczenie raka piersi

Schemat leczenia raka piersi może obejmować metody takie jak: zabieg chirurgiczny, radioterapia, hormonoterapia, chemioterapia lub immunoterapia – Rycina 12 [24]. Wybór podejścia terapeutycznego uwzględnia dużą różnorodność fenotypów i genotypów nowotworu piersi oraz zależy przede wszystkim od: typu molekularnego, typu histologicznego, stopnia zaawansowania klinicznego (*staging*), stopnia złośliwości histologicznej (*grading*), statusu menopauzalnego oraz chorób współtowarzyszących [24-26].



Rycina 12. Metody wykorzystywane w leczeniu raka piersi (rycina własna) [24].

Dodatkowo w przypadku raka piersi zastosowanie leczenia uzupełniającego w postaci leczenia systemowego i/lub radioterapii przed lub po leczeniu chirurgicznym pozwala wyróżnić odpowiednio terapię neoadjuwantową lub adjuwantową – Rycina 13 [27].



Rycina 13. Podział leczenia uzupełniającego (rycina własna) [27].

Ze względu na heterogeniczny charakter raka piersi oraz pomimo dostępności wielu opcji terapeutycznych cały czas poszukiwane są nowe terapie, które pozwoliłyby na możliwie największe zmniejszenie ilości nawrotów oraz zgonów związanych z nawrotem choroby [26].

1.6.1. Terapia neoadjuwantowa

Termin terapia neoadjuwantowa dotyczy leczenia nowotworu stosowanego przed zabiegiem operacyjnym. Ma na celu zmniejszenie masy guza i umożliwienie operacji oszczędzającej pierś zamiast mastektomii [28]. Tradycyjnie leczenie systemowe wśród pacjentek z rakiem piersi było stosowane po operacji. Jednak w ostatnich latach systemową terapię neoadjuwantową uważa się za równie skuteczną opcję terapeutyczną w porównaniu

z terapią adjuwantową [29]. Najczęściej stosowane rodzaje terapii neoadjuwantowych wraz z określeniem celu terapeutycznego oraz grupy docelowej zostały zawarte w Tabeli 5.

Tabela 5. Rodzaje terapii neoadjuwantowej na podstawie [27, 30].

Rodzaj terapii neoadjuwantowej	Grupa docelowa	Cel zastosowania terapii neoadjuwantowej
Hormonoterapia	- głównie pacjentki z rakiem piersi ER (+) po menopauzie	- zwiększa częstość operacji oszczędzających pierś
Chemioterapia	- głównie pacjentki z miejscowo zaawansowanym rakiem piersi bez przerzutów odległych, - największe szanse powodzenia w przypadku raka piersi HER2 (+) lub potrójnie ujemnego	- zwiększa częstość operacji oszczędzających pierś, - pozwala na uniknięcie wycięcia pachowych węzłów chłonnych

ER – receptor estrogenowy, ang. estrogen receptor; HER2 – ludzki naskórkowy czynnik wzrostu 2, ang. human epidermal growth factor receptor 2.

1.6.2. Terapia adjuwantowa

Terapia adjuwantowa jest podawana po zastosowaniu leczenia chirurgicznego w celu wyeliminowania klinicznie i radiologicznie utajonej choroby mikroprzerzutowej, która w przypadku braku zastosowania leczenia może przekształcić się w jawne przerzuty [30]. Określenie ryzyka nawrotu choroby nowotworowej oraz podjęcie decyzji, którzy pacjenci powinni otrzymać leczenie uzupełniające opiera się m.in. na informacjach takich jak rozmiar guza, stan zajęcia węzłów chłonnych oraz stan ekspresji receptorów hormonalnych [31].

Terapia hormonalna, chemioterapia i terapia celowana anty-HER2 oparte są na różnych mechanizmach przeciwnowotworowych jednak wszystkie mają za zadanie poprawę wskaźników przeżycia wolnego od progresji choroby jak również przeżycia całkowitego [27].

Tabela 6 przedstawia dostępne terapie adjuwantowe w zależności od klasyfikacji molekularnej nowotworu piersi.

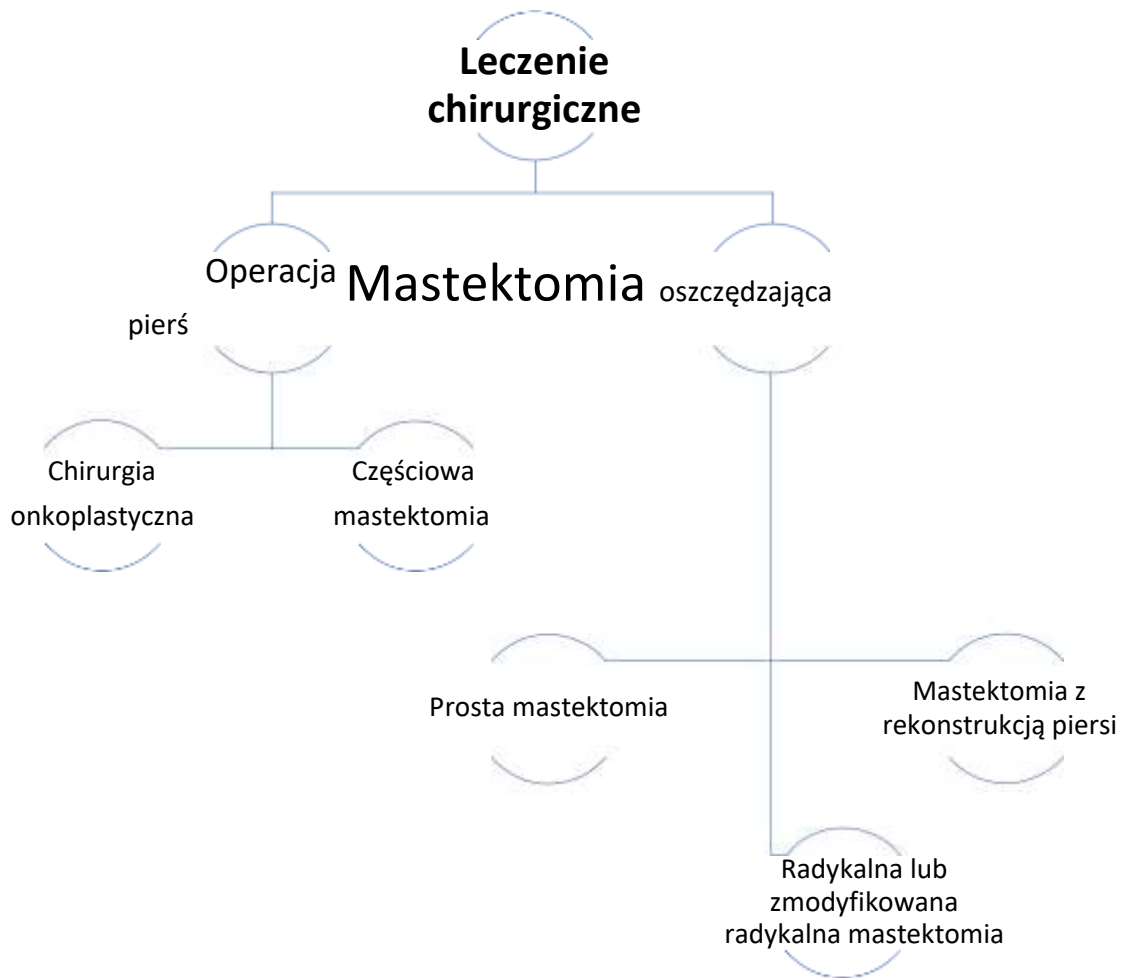
Tabela 6. Możliwości ogólnoustrojowej terapii adjuwantowej w raku piersi w modyfikacji własnej [32].

Podtypy raka piersi			Ogólnoustrojowa terapia adjuwantowa		
Ekspresja receptorów hormonalnych	Ekspresja HER2	Podtyp molekularny	Hormono-terapia	Chemio-terapia	Immunoterapia (anty-HER2)
+	-	Luminalny A lub luminalny B HER2 (-)	Tak	Tak	Nie
+	+	Luminalny B HER2 (+)	Tak	Tak	Tak
-	+	Nieluminalny HER2 (+)	Nie	Tak	Tak
-	-	Potrójnie ujemny	Nie	Tak	Nie

HER2 – ludzki naskórkowy czynnik wzrostu 2, ang. human epidermal growth factor receptor 2.

1.6.3. Rodzaje leczenia chirurgicznego raka piersi

Dla większości kobiet z rakiem piersi resekcja guza nadal pozostaje podstawowym sposobem leczenia [33]. Stosowane opcje chirurgiczne można podzielić na dwie główne grupy w zależności od usunięcia części lub całego gruczołu piersiowego, w którym znajduje się guz. Wyróżniamy operację oszczędzającą pierś (BCS, ang. breast-conserving surgery) obejmującą częściową mastektomię i chirurgię onkoplastyczną oraz mastektomię składającą się z mastektomii prostej, mastektomii radykalnej lub radykalnej zmodyfikowanej, a także z mastektomii z rekonstrukcją piersi – Rycina 14. W ostatnich latach obserwuje się rosnące zastosowanie leczenia chirurgicznego połączonego z metodami rekonstrukcji piersi, które stanowią kluczową rolę w poprawie jakości życia pacjentek [34].



Rycina 14. Podział leczenia chirurgicznego raka piersi na podstawie [34].

Według danych Amerykańskiego Towarzystwa Onkologicznego (ACS, ang. American Cancer Society) wśród pacjentek z I i II stopniem zaawansowania najczęstszym zabiegiem operacyjnym była BCS wraz z radioterapią uzupełniającą [25]. Wiele randomizowanych badań klinicznych z okresem obserwacji do 20 lat wykazało, że BCS jest bezpieczna w raku piersi I i II stopnia zaawansowania i wiąże się z przeżyciem równoważnym przeżyciu obserwowanemu po zabiegu mastektomii [30]. Dodatkowo przy zastosowaniu technik chirurgii onkoplastycznej, odsetek nawrotów regionalnych nie wykazuje różnic statystycznych w porównaniu z mastektomią [34].

1.6.4. Hormonoterapia w raku piersi

W większości przypadków ze względu na duże prawdopodobieństwo późnych nawrotów wśród pacjentek z dodatnim statusem receptora estrogenowego zaleca się uzupełniające leczenie hormonalne [31]. Ze względu na mechanizm działania leki stosowane w ramach hormonoterapii raka piersi możemy podzielić na selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERMs, ang. selective estrogen receptor modulators), inhibitory aromatazy (AIs, ang. aromatase inhibitors) oraz selektywne degradatory receptora estrogenowego (SERDs, ang. selective estrogen receptor degraders) – Tabela 7 [35].

Dobór schematu leczenia hormonalnego zależy przede wszystkim od statusu menopauzalnego. Inhibitory aromatazy zazwyczaj są stosowane tylko w przypadku pacjentek po menopauzie. Natomiast tamoksyfen może być stosowany zarówno w grupie pacjentek przed jak i po menopauzie [30]. Aktualnie coraz bardziej powszechne staje się stosowanie tamoksyfenu i/lub inhibitorów aromatazy przez okres od 5 do 10 lat [31].

Tabela 7. Podział leków stosowanych w hormonoterapii raka piersi w zależności od mechanizmu działania [35].

Grupa leków	Przedstawiciele	Mechanizm działania
Selektywne modulatory receptora estrogenowego	Tamoksyfen	Wiązanie się z ER α -> antagonizowanie transkrypcji genów związanych z ER α -> hamowanie proliferacji komórek raka piersi
Inhibitory aromatazy	Letrozol, Anastrozol, Eksemestan	Hamowanie aromatazy -> znaczne zmniejszenie konwersji androgenów do estrogenów -> spadek biosyntezy estrogenów
Selektywne degradatory receptora estrogenowego	Fulwestrant	Konkurowanie z estrogenami -> wiązanie się z ER α -> inicjowanie degradacji receptora estrogenowego

ER – receptor estrogenowy, ang. estrogen receptor.

1.6.5. Chemioterapia w raku piersi

Kolejnym typem leczenia uzupełniającego przy wyborze, którego kluczowe znaczenie ma typ molekularny raka piersi jest chemioterapia [26]. Celem chemioterapii jest przedłużenie całkowitego przeżycia, złagodzenie lub zapobieganie objawom związanym z nowotworem oraz poprawa ogólnej jakości życia [36].

Chemioterapia działa poprzez celowanie w etap podziałów komórkowych. Ma to kluczowe znaczenie, ponieważ inwazyjne komórki nowotworowe charakteryzują się niekontrolowanym wzrostem, a zatem są odpowiednim celem dla tego rodzaju terapii. Jednak istnieją również inne wykazujące podobny profil proliferacji komórki nienowotworowe, które znajdują się w mieszkach włosowych, paznokciach, jamie ustnej, przewodzie pokarmowym i szpiku kostnym. Ostatecznie prowadzi to do licznych niepożądanych skutków ubocznych związanych z zastosowaniem chemioterapii tj. wymioty, wypadanie włosów i neutropenia [36].

Grupy leków chemioterapeutycznych stosowanych w raku piersi z przerzutami obejmują taksany, antracykliny i antymetabolity – Tabela 8 [36]. W przypadku leczenia uzupełniającego inwazyjnego raka piersi we wczesnym stopniu zaawansowania najczęściej stosowanymi lekami są taksany wraz z antracyklinami [26]. Ten rodzaj leczenia uzupełniającego zaleca się również pacjentkom z przerzutami do węzłów chłonnych ze względu na gorsze rokowanie w porównaniu z pacjentkami bez zajętych węzłów chłonnych [30].

Tabela 8. Przykładowe leki stosowane w chemioterapii raka piersi w zależności od mechanizmu działania [34].

Grupa leków	Przedstawiciel	Mechanizm działania
Taksany	Docetaksel, Paklitaksel	Inhibitory mikrotubul
Antracykliny	Doksorubicyna, Epirubicyna, Pegylowana Lipodoksorubicyna	Uszkadzają materiał genetyczny komórek nowotworowych
Antymetabolity	Kapecytabina	Antymetabolit pirymidyny

1.6.6. Radioterapia w raku piersi

Radioterapia jest jedną z głównych metod leczenia uzupełniającego raka piersi przeprowadzaną w około 87% przypadków. Zapobiega powstawaniu miejscowych nawrotów oraz pozytywnie wpływa na wskaźniki związane z przeżyciem całkowitym u chorych z wczesnym oraz miejscowo zaawansowanym rakiem piersi [37].

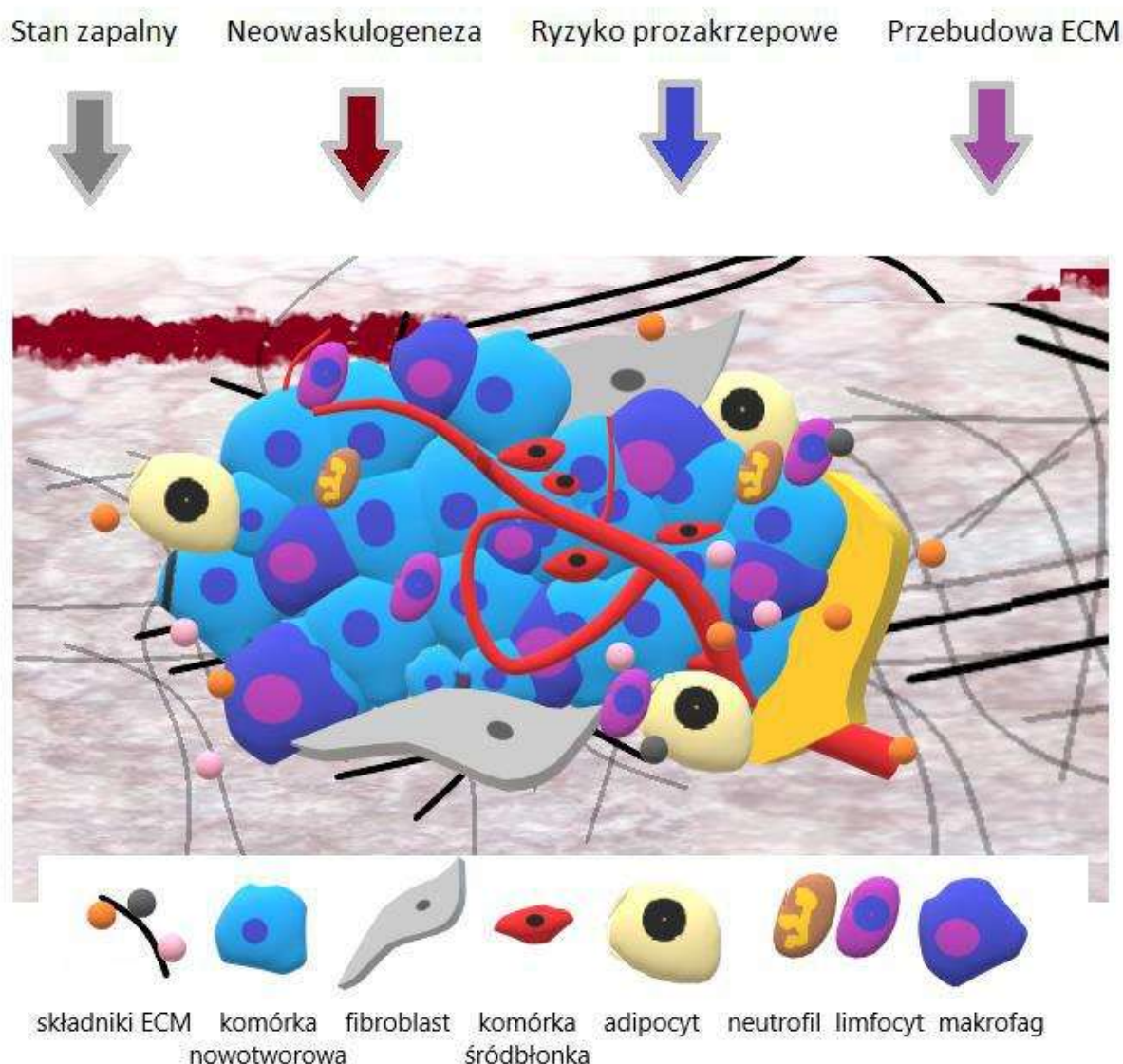
Radioterapia całej piersi jest integralną częścią terapii oszczędzającej pierś. Najczęściej stosowana standardowa dawka radioterapii podana na całą pierś wynosi 50 Gy/50,4 Gy, w 25-28 sesjach po 1,8-2,0 Gy dziennie. Schemat ten zakłada możliwość podania w loży guza dodatkowej dawki promieniowania wynoszącej od 10 do 16 Gy [37].

1.6.7. Immunoterapia w raku piersi

Immunoterapia stosowana w leczeniu pacjentek z rakiem piersi HER2-dodatnim opiera się w głównej mierze na terapii trastuzumabem, czyli rekombinowanym humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko zewnątrzkomórkowej domenie receptora HER2. Wstępne badania wykazały prawie 50% zmniejszenie częstości nawrotów wśród pacjentów, u których oprócz chemioterapii zastosowano również trastuzumab. Jednak ze względu na brak dowodów potwierdzających jego skuteczność w monoterapii nie zaleca się jego stosowania bez połączenia z chemioterapią [29, 30].

2. Mikrośrodowisko nowotworowe

Mikrośrodowisko nowotworowe obejmuje proliferujące komórki nowotworowe oraz zrekrutowane prawidłowe komórki tj. fibroblasty, komórki układu immunologicznego, komórki śródbłonna, makrofagi, adipocyty, a także cząsteczki sygnałowe i składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. extracellular matrix) – Rycina 15. Jest to stale zmieniające się środowisko o charakterze prozapalnym, prozakrzepowym i proangiogennym, które rozwija się wraz z upływem czasu i progresją nowotworu oraz różni się w zależności od rodzaju nowotworu [38, 39].



Rycina 15. Schemat budowy mikrośrodowiska nowotworowego na podstawie Mittal i wsp. [39].

Badania wykazały, że komórki nowotworowe mogą rozwijać się tylko w nieprawidłowo zmienionym mikrośrodowisku. Różne białka wydzielane przez komórki zrębowe mogą nadmiernie aktywować pętle autokrynne i parakrynne, które wpływają na zachowanie i aktywację komórek związanych z mikrośrodowiskiem guza. Interakcje między zrębem a komórkami nowotworowymi, wraz z podstawowymi defektami genetycznymi komórek nowotworowych, dyktują charakterystykę wzrostu, morfologię i inwazyjność nowotworu [39].

Również powstawanie i rozwój przerzutów nowotworowych może wystąpić tylko w niektórych miejscach. Komórki nowotworowe mogą indukować tworzenie się w odległych narządach mikrośrodowisk, sprzyjających przeżyciu i rozrostowi komórek nowotworowych przed ich faktycznym przybyciem do tych miejsc. Wykazano, że wśród chorych na raka piersi powstawanie przerzutów może rozpocząć się już na 5-7 lat przed rozpoznaniem guza pierwotnego [39]. Jednymi ze zmian obserwowanych w obrębie niszy przed przerzutami są zmiany naczyniowe, takie jak zwiększona przepuszczalność. Uważa się, że przełączenie angiogenne w przypadku przerzutów wiąże się z progresją uśpionych mikroprzerzutów do klinicznie jawnych zmian i nie jest wyzwalane przed pojawieniem się komórek nowotworowych. W modelu mysim na etapie niszy przedprzerzutowej wykazano wzrost ekspresji genów powiązanych z angiogenezą tj. naczyniowo śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor), receptora dla VEGF typu 1 (VEGFR-1, ang. vascular endothelial growth factor receptor type 1) oraz receptora dla VEGF typu 2 (VEGFR-2, ang. vascular endothelial growth factor receptor type 2) [40].

Przerzuty do narządów odległych stanowiące wznowę choroby nowotworowej są

najczęstszą przyczyną śmierci pacjentek z nowotworem piersi. Ich występowanie oraz

rokowanie zależy zasadniczo od podtypu molekularnego nowotworu piersi. W Tabeli 9 przedstawiono najczęstsze miejsca przerzutów w zależności od podtypu molekularnego nowotworu piersi [14].

Warto również zwrócić uwagę na czas wystąpienia wznowy choroby w zależności od podtypu molekularnego. Nowotwory luminalne A zwykle wykazują późno występujące przerzuty (po ok. 5–10 latach od rozpoznania) i pozwalają na dłuższe przeżycie w przeciwieństwie do podtypu potrójnie ujemnego, który zwykle daje przerzuty w przeciągu 2 lat od rozpoznania i wiąże się z niekorzystnym rokowaniem [14].

Tabela 9. Lokalizacja oraz częstość występowania przerzutów w raku piersi w zależności od podtypu molekularnego na podstawie Harbeck i wsp. [14].

Miejsce przerzutu	Typ nowotworu piersi	Częstość (%)
Pachowe węzły chłonne	-	30-50%
Kości	-	67%
	Potrójnie ujemny	40%
	Nieluminalny HER2 (+)	60%
	Luminalny A	70%
	Luminalny B	79%
Wątroba	-	40,8%
	Luminalny A	25%
	Luminalny B	30%
	Potrójnie ujemny	35%
	Nieluminalny HER2 (+)	45%
Płuca	-	36,9%
	Luminalny A	25%
	Luminalny B	30%
	Potrójnie ujemny	35%
	Nieluminalny HER2 (+)	45%
Mózg	-	12,6%
	Luminalny A	<10%
	Luminalny B	10-15%
	Potrójnie ujemny	25%
	Nieluminalny HER2 (+)	30%

HER2 – ludzki naskórkowy czynnik wzrostu 2, ang. human epidermal growth factor receptor 2.

2.1. Stan zapalny

Układ immunologiczny zwykle próbuje zidentyfikować komórki nowotworowe oraz komórki z nabytymi mutacjami i je zniszczyć [7]. Mutagenne środowisko zapalne może promować m.in. angiogenezę i umożliwiać komórkom nowotworowym uniknięcie odrzucenia

immunologicznego. Stan zapalny w obrębie mikrośrodowiska guza odgrywa kluczową rolę w inicjacji i progresji raka piersi [9].

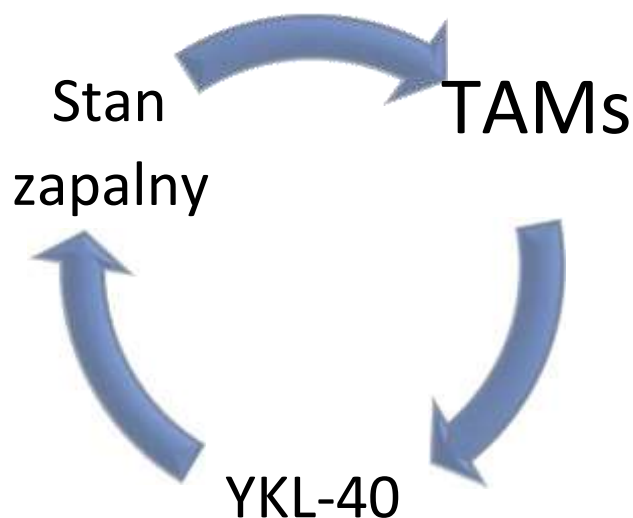
2.1.1. Makrofagi związane z guzem

Makrofagi związane z guzem (TAMs, ang. tumour-associated macrophages) są kluczowymi komórkami odporności wrodzonej znajdującymi się w mikrośrodowisku guza. Stanowią do 50% masy komórek nowotworowych. TAMs są wysoce heterogenicznymi komórkami, które pochodzą z rezydentnych makrofagów specyficznych dla tkanki oraz z nowo rekrutowanych monocytów. Zmienność TAMs silnie zależy od typu nowotworu, stadium zaawansowania i heterogeniczności wewnętrznej zrębu guza. Większość TAMs jest zaprogramowana przez mikrośrodowisko guza tak aby wspierać wzrost guza pierwotnego i rozprzestrzenianie się do narządów odległych. Jednak TAMs mogą również ograniczać wzrost guza i przerzuty [39, 41].

Dodatkowo TAMs regulują wzrost guzów pierwotnych, przeciwnowotworową adaptacyjną odpowiedź immunologiczną, angiogenezę, przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, wynaczynienie w naczyniach i w miejscach przerzutów oraz stwarzają korzystne dla komórek przerzutowych mikrośrodowisko w narządach wtórnych. Mechanizmy sygnalizacyjne, epigenetyczne i metaboliczne współpracują, tworząc funkcjonalne fenotypy TAMs [41].

Rak piersi był pierwszym nowotworem, w którym na różnych modelach zwierzęcych wykazano wspierającą komórki nowotworowe rolę TAMs. Dodatkowo u pacjentów z rakiem piersi, jajnika i prostaty zwiększona ilość TAMs jest wyraźnym wskaźnikiem szybkiego wzrostu masy guza, agresywnego procesu przerzutowego i ograniczonej skuteczności leczenia [39, 41].

Nowym biomarkerem makrofagów związanych z nowotworem jest białko YKL-40, które wzmacnia stan zapalny w mikrośrodowisku nowotworu – Rycina 16. Białko to może być wytwarzane zarówno przez makrofagi, jak i komórki nowotworowe [41]. W makrofagach YKL-40 jest indukowane przez interferon γ (IFN γ , ang. interferon gamma) i może być uważane za biomarker populacji makrofagów M1 określanej mianem populacji prozapalnej regulującej rozwój nowotworu [39, 41]. Również interleukina 6 (IL-6, ang. interleukin 6) oraz hipoksja mogą pobudzać syntezę YKL-40 [42].



Rycina 16. Wpływ YKL-40 na stan zapalny w mikrośrodowisku nowotworowym (rycina własna) [41].

Białko to zapobiega apoptozie, a także promuje proliferację komórek nowotworowych poprzez zwiększenie aktywności czynników antyapoptotycznych oraz proproliferacyjnych. Jego dokładna rola biologiczna nie jest do końca poznana, jednak wykazano, że bierze udział w przebudowie ECM oraz jest silnym induktorem angiogenezy poprzez działanie jako chemoatraktant i stymuluje migrację oraz reorganizację komórek śródbłonna naczyniowego [42, 43].

W nowotworach piersi, płuc, prostaty, wątroby, pęcherza moczowego oraz okrężnicy stwierdzono negatywną korelację pomiędzy stężeniem YKL-40 w surowicy i/lub osoczu a wynikami klinicznymi i wskaźnikiem przeżycia całkowitego [39, 41, 42]. Jednak co ciekawe, badania sugerują, że YKL-40 nie jest czynnikiem sprawczym zmian nowotworowych, a raczej biomarkerem stanu zapalnego [42].

2.1.2. Stan zapalny związany z tkanką tłuszczową

Adipocyty i inne komórki tkanki tłuszczowej syntetyzują i wydzielają wiele aktywnych biologicznie związków o działaniu autokrynnym, parakrynnym i endokrynnym, m.in. leptynę, adiponektynę, rezystynę, wisfatynę oraz chemerynę [44]. Dlatego tkanka tłuszczowa stanowi istotny narząd endokryny [45].

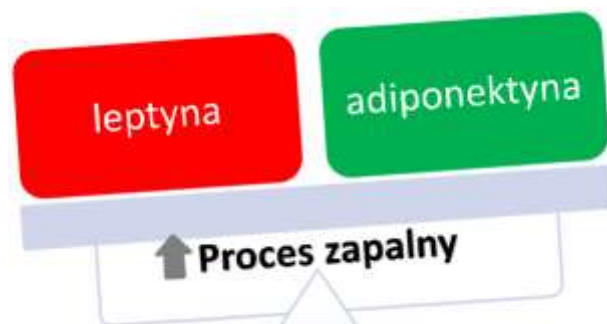
Zmieniona biologia tkanki tłuszczowej, powszechnie występująca w przypadku podwyższonego BMI może prowadzić do zaburzeń metabolicznych, zaburzonej produkcji hormonów steroidowych i przewlekłego subklinicznego stanu zapalnego [45].

Leptyna uważana za prozapalną adipokinę aktywuje makrofagi, monocyty i komórki NK (NK, ang. natural killer cells) oraz reguluje proliferację, fagocytozę, chemotaksję i uwalnianie wolnych rodników tlenowych neutrofili. Produkowana jest głównie w dojrzałych komórkach białej tkanki tłuszczowej. Głównymi czynnikami wpływającymi na stężenie leptyny we krwi są masa tkanki tłuszczowej i wielkość adipocytów. Uwolniona do krwi leptyna jest transportowana do mózgu i wiąże się z jej receptorami w podwzgórzu. Skutkuje to zmniejszeniem apetytu i ograniczeniem przyjmowania pokarmów, a następnie zmniejszeniem ilości tkanki tłuszczowej i zwiększonym wydatkowaniem energii. Dlatego leptyna jest obecnie uważana za hormon sytości [44].

Natomiast adiponektyna jest białkiem, które hamuje proliferację komórek mięśni gładkich, wzmacnia syntezę tlenku azotu i stymuluje angiogenezę. Liczne badania prezentują adiponektynę jako cytokinę przeciwzapalną. Wykazano, że bezpośrednio zwiększa produkcję interleukiny 10 (IL-10, ang. interleukin 10) przez makrofagi i zmniejsza produkcję prozapalnych cytokin tj. czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α , ang. tumor necrosis factor α) i IL-6. Ponadto hamuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłona naczyniowego oraz produkcję cytokin w makrofagach, hamując tym samym procesy zapalne zachodzące we wczesnych fazach miażdżycy i mikroangiopatii. Uważa się, że zwiększone stężenie adiponektyny w surowicy może występować w odpowiedzi na uszkodzenie śródbłona naczyniowego [44].

Prawidłowa tkanka tłuszczowa, a zwłaszcza dojrzałe adipocyty, wytwarzają adiponektynę oraz niewielkie ilości leptyny i cytokin prozapalnych. Nadwaga i otyłość prowadzą jednak do zasadniczego przesunięcia w kierunku zwiększenia aktywności leptyny równoległe ze zmniejszeniem biodostępności adiponektyny i nadprodukcji prozapalnych makrofagów M1 [42]. Deregulacja stężeń adipokin (głównie wzrost stężenia leptyny i spadek stężenia adiponektyny) zachodząca w przebiegu otyłości prowadzi m.in. do przewlekłego stanu zapalnego - Rycina 17.

Nadwaga i otyłość

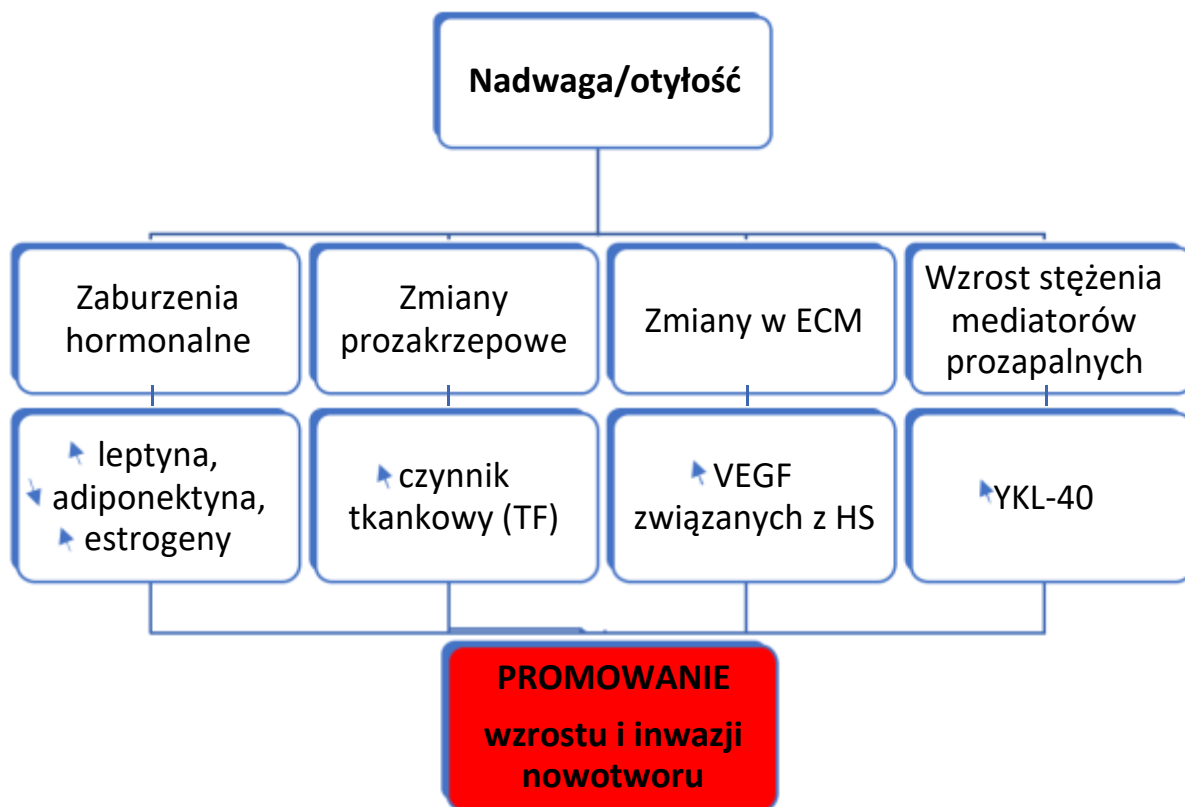


Rycina 17. Deregulacja profilu adipokin w przebiegu nadwagi i otyłości promująca proces zapalny (rycina własna) [44].

Badania wykazały, że stan zapalny białej tkanki tłuszczowej (WAT, ang. white adipose tissue) związany z otyłością koreluje z mechanicznymi zmianami w macierzy zewnątrzkomórkowej, które sprzyjają wzrostowi guza [45]. Dodatkowo zaburzenie stężeń leptyny i adiponektyny odgrywa istotną rolę w biologii nowotworu, ponieważ leptyna promuje angiogenezę nowotworową, inwazję komórek nowotworowych i powstawanie przerzutów, podczas gdy adiponektyna posiada właściwości przeciwnowotworowe, w tym działanie antyproliferacyjne, antymigracyjne i proapoptotyczne [42].

Obecnie podstawowe mechanizmy biologiczne, które łączą otyłość z rakiem piersi, skupiają się nie tylko na zwiększonym wydzielaniu prozapalnych mediatorów oraz czynników wzrostu ale również na nadmiernej ekspozycji gruczołów sutkowych na obfite wydzielanie estrogenów [42]. U kobiet po menopauzie krążące estrogeny są związane ze zwiększonym ryzykiem hormonowrażliwych nowotworów piersi. W tej grupie estrogeny wytwarzane są głównie w obwodowej tkance tłuszczowej w wyniku przekształcenia prekursorów androgenów produkowanych przez nadnercza. Produkcja estrogenów przez konwersję aromatazy z androgenów odgrywa ważną rolę w promocji nowotworu piersi. Aktywny estradiol prowadzi do rozwoju raka piersi poprzez wiązanie się z ER α , który jest modyfikowany przez interakcję receptora z różnymi szlakami przekazywania sygnału [46].

Skutki dysfunkcji tkanki tłuszczowej wykraczają daleko poza mikrośrodowisko guza i wpływają na procesy ogólnoustrojowe, które mogą synergistycznie napędzać miejscowy wzrost guza, jednocześnie promując przerzuty [47]. Rycina 18 przedstawia wybrane procesy związane z nadwagą i otyłością, które sprzyjają rozwojowi nowotworów.



Rycina 18. Udział nadwagi oraz otyłości w promowaniu wzrostu i inwazji nowotworu (rycina własna) [45-47].

Ostatnie badania dotyczące wzajemnych oddziaływań między adipocytami a komórkami nowotworowymi wskazują, że adipocyty zajmują ważne miejsce w progresji raka piersi [39]. Inwazja nowotworu sprzyja zmianom morfologicznym w adipocytach na styku nowotwór-podścielisko [45]. Adipocyty związane z rakiem (CAAs, ang. cancer-associated adipocytes) zlokalizowane na granicy guza nowotworowego wykazują zmniejszone rozmiary w porównaniu do prawidłowych adipocytów oraz nabywają fenotyp podobny do fibroblastów, co sprzyja dalszej inwazji nowotworu poprzez wydzielanie licznych proteaz i cytokin, w tym IL-6 [39, 45]. Dodatkowo CAAs tworzą i przyczyniają się do gromadzenia gęstego kolagenowego zrębu zwiększając tym samym sztywność ECM [45].

Szczególnie interesujący jest fakt, że nowotwory takie jak rak piersi czy nowotwory narządów wewnętrznych, powstają w obrębie lub w sąsiedztwie tkanki tłuszczowej [45]. Otyłość, w której równowaga białek wydzielniczych tkanki tłuszczowej jest zaburzona, jest identyfikowana jako negatywny czynnik prognostyczny dla pacjentek z rakiem piersi niezależnie od statusu menopauzalnego, zaawansowania nowotworu i ekspresji receptorów hormonalnych. Badania kliniczne wykazały, że u kobiet z otyłością częściej stwierdza się zajęcie węzłów chłonnych w momencie rozpoznania oraz większą skłonność do przerzutów odległych [39].

Leptyna jest najważniejszym mediatorem wiążącym otyłość z rakiem piersi [46]. Jej wysokie stężenie podobnie jak niskie stężenie adiponektyny jest złym czynnikiem rokowniczym [42]. Leptyna promuje inicjację, rozwój, wzrost i przerzuty nowotworu. Zwiększa także ryzyko raka piersi poprzez interakcje z innymi cząsteczkami sygnalizacyjnymi, w tym ER α , czynnikami wzrostu, Notch i czynnikami zapalnymi [46]. Dodatkowo wzmacnia śródbłonkową ekspresję cyklooksygenazy 2 (COX-2, ang. cyclooxygenase 2) poprzez mechanizm zależny od kinazy białkowej aktywowanej przez szlak p38 oraz PI3K/Akt. Mechanizm ten może być regulowany przez aktywację VEGFR-2. W mysim modelu raka piersi leptyna zwiększa nie tylko ekspresję VEGF, a także jego receptora VEGFR-2. Ponadto leptyna w raku piersi indukuje kilka szlaków sygnałowych w celu zwiększenia ekspresji interleukiny 1 (IL-1, ang. interleukin 1), która reguluje proangiogenne działanie VEGF/VEGFR-2. Sugeruje to, że leptyna może promować neoangiogenezę oraz tworzenie przerzutów [47].

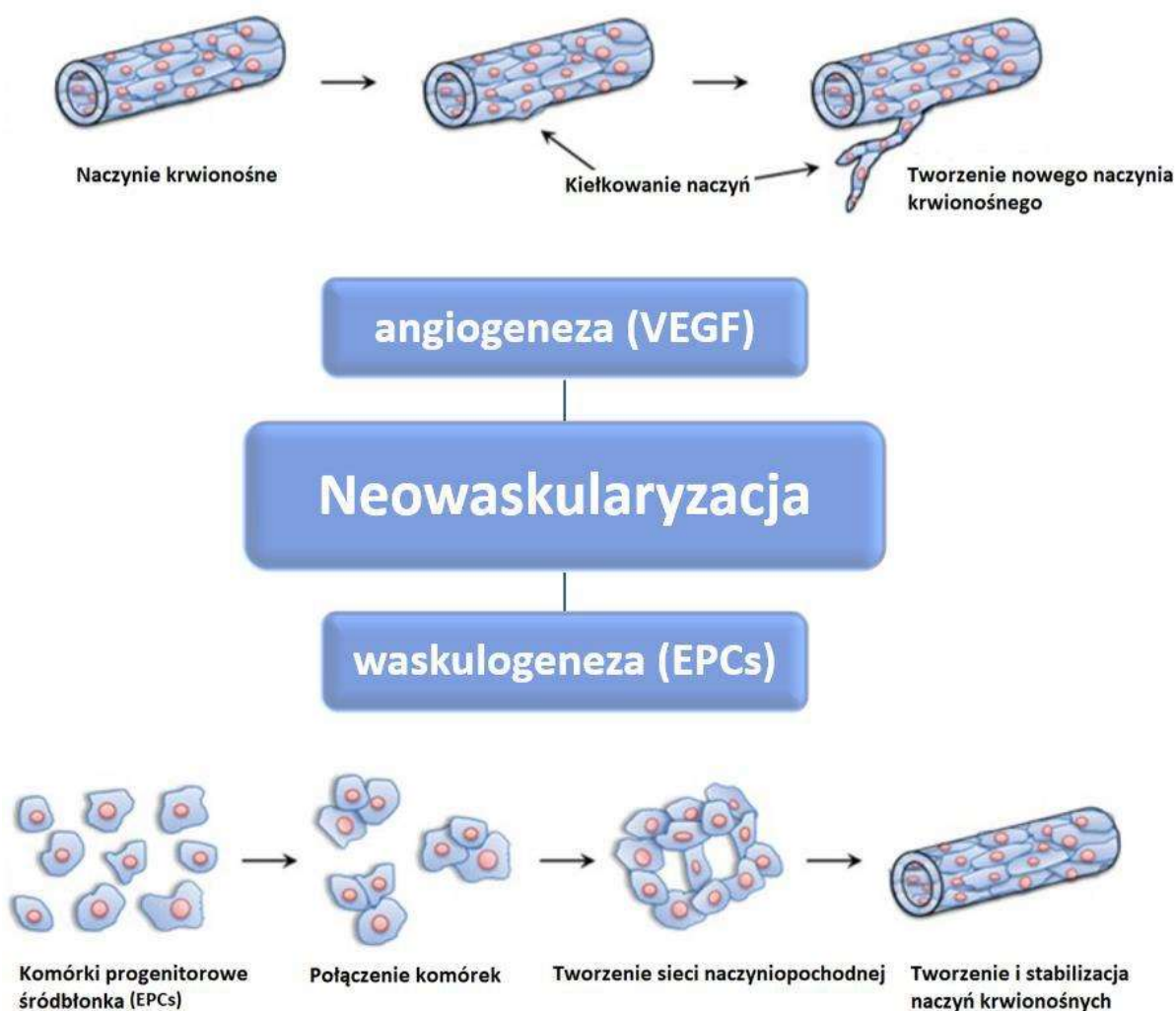
2.2. Neowaskularyzacja

Powszechną cechą guzów litych jest niedotlenienie będące patofizjologiczną konsekwencją strukturalnie i funkcjonalnie zaburzonego mikrokrążenia [48]. Ze względu na szybką proliferację komórek nowotworowych guzy przechodzą szybką neowaskularyzację, a nowo powstała sieć naczyń krwionośnych charakteryzuje się niskim stopniem dojrzałości [49].

Naczynia krwionośne w obrębie guza są kręte, zdeorganizowane i rozszerzone. Niedojrzałość naczyń oraz zaburzenia połączeń ścisłych pomiędzy komórkami śródbłonka, komórkami okołonaczyniowymi i błoną podstawną prowadzą do nadmiernej przepuszczalności, słabej perfuzji i zwiększonej hipoksji. Dodatkowo sieć naczyniowa guza

charakteryzuje się dużą niejednorodnością gęstości naczyń z obszarami silnie oraz słabo unaczynionymi. W związku z tym dochodzi do niedotlenienia, kwasicy, niedoboru glukozy oraz naciekania komórek odpornościowych w obrębie mikrośrodowiska guza, które sprzyjają progresji raka, przerzutom i lekooporności [49, 50].

W ramach neowaskularyzacji możemy wyróżnić kilka mechanizmów powstawania naczyń krwionośnych. Każdy z nich może mieć znaczenie w konkretnym typie nowotworu lub na określonym etapie ewolucji nowotworu [48]. Rycina 19 przedstawia procesy angiogenezy i waskulogenezy zachodzące w ramach neowaskularyzacji guza.



Rycina 19. Neowaskularyzacja z uwzględnieniem angiogenezy oraz waskulogenezy w modyfikacji własnej [48].

2.2.1. Angiogeneza

Angiogeneza to tworzenie nowych naczyń krwionośnych z istniejącego już układu naczyniowego. Składa się ze skoordynowanych, sekwencyjnych i współzależnych etapów

Wymaga ona (1) degradacji błony podstawnej, (2) migracji komórek śródbłonka oraz (3) inwazji macierzy zewnątrzkomórkowej z (4) proliferacją komórek śródbłonka i (5) tworzeniem naczyń włosowatych przed (6) dojrzewaniem i stabilizacją nowego układu naczyniowego [48].

Proces angiogenezy rozpoczyna się w odpowiedzi na bodziec pochodzący z tkanki mięsistej, który wskazuje na potrzebę wzrostu nowych naczyń krwionośnych. Może wynikać z hipoksji, zmian metabolicznych lub mechanicznych i jest odbierany przede wszystkim przez śródbłonek naczyniowy. Po zainicjowaniu angiogenezy, w tkance rozwijają się gradienty cząsteczek pro- i anty- angiogennych, kierujące nowo kiełkujące naczynie krwionośne do ostatecznego miejsca przeznaczenia. Na tym etapie dochodzi również do przebudowy ECM i uwolnienia czynników wzrostu związanych z białkami ECM. Następnie dochodzi do migracji komórek śródbłonka (ECs, ang. endothelial cells) do źródła angiogenego bodźca oraz zachodzą decyzje dotyczące finalnej struktury nowego naczynia takie jak liczba i częstość występowania rozgałęzień. Kolejny etap ma na celu m.in. utworzenie połączenia z innym naczyniem tak aby móc zapewnić funkcjonalny transport tlenu (O_2) i substancji odżywczych. W końcowej fazie angiogenezy nowo utworzone naczynia włosowate przenoszące krew, aby uniknąć regresji ulegają stabilizacji przez komórki ścienne oraz perycyty [51].

Promotory i inhibitory angiogenezy mogą pochodzić zarówno z komórek nowotworowych jak i z mikrośrodowiska nowotworu. Zatem komórki nowotworowe mogą rekrutować komórki zapalne, takie jak makrofagi i komórki tuczne, które są bogatym źródłem czynników proangiogennych i cytokin, lub mogą indukować uwalnianie czynników wzrostu lub ich receptorów z macierzy zewnątrzkomórkowej. Również płytki krwi, które są bogatym źródłem czynników proangiogennych mogą być aktywowane przez komórki śródbłonka guza [48]. Tabela 10 przedstawia wybrane inhibitory i aktywatory angiogenezy wraz ze wskazaniem mechanizmu działania.

Tabela 10. Wybrane endogenne modulatory angiogenezy [42].

Aktywator	Mechanizm działania	Inhibitor	Mechanizm działania
VEGF	* Indukuje angiogenezę; * Zwiększa przepuszczalność naczyń	Angiopoetyna-2	* Antagonista angiopoetyny-1
EGF	* Wspomaga wzrost komórek śródbłonka naczyniowego	Trombospondyna-1,2	* Hamuje migrację, wzrost, adhezję i przeżycie komórek śródbłonka
TF	* Indukuje ekspresję VEGF; * Hamuje ekspresję trombospondyny	Kolagen	* Substrat dla MMP
PGF	* Zaangażowanie w migrację komórek śródbłonka naczyniowego	Angiostatyna	* Hamuje angiogenezę guza
Angiopoetyna-1	* Stabilizuje śródbłonek naczyniowy	TIMPs	* Tłumi patologiczną angiogenezę
MMP	* Degraduje ECM	PF-4	* Hamuje wiązanie bFGF i VEGF

VEGF – naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu, ang. vascular endothelial growth factor; EGF – naskórkowy czynnik wzrostu, ang. epidermal growth factor; TF – czynnik tkankowy, ang. tissue factor; PGF – łożyskowy czynnik wzrostu, ang. placental growth factor; TIMPs – tkankowe inhibitory metaloproteinaz, ang. tissue inhibitors of metalloproteinases; PF-4 – czynnik płytkowy 4, ang. platelet factor 4; bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, ang. basic fibroblast growth factor; MMP – metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej, ang. matrix metalloproteinases.

Przejsie na fenotyp angiogeny wymaga zmiany równowagi między endogennymi czynnikami proangiogennymi i antyangiogennymi, które regulują wzrost i rozwój naczyń. Regulacja angiogenezy jest w dużym stopniu kontrolowana przez rodzinę białek VEGF. Kluczowym mediatorem angiogenezy związanej ze wzrostem i rozwojem nowotworów jest VEGF-A aktywujący kaskady sygnałowe poprzez VEGFR-1 oraz VEGFR-2 [52]. Receptory te są kodowane przez oddzielne geny i należą do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych. Ekspresję VEGFR wykazano na komórkach śródbłonka, makrofagach, komórkach tucznych i komórkach mięśni gładkich. Chociaż VEGFR-1 wiąże VEGF-A z wysokim powinowactwem,

uważa się, że działa głównie poprzez modulowanie dostępności VEGF-A do wiązania z VEGFR-2. Receptory dla VEGF-A, oprócz tych związanych z błonami komórkowymi, występują również w postaci rozpuszczalnej (sVEGFR-1 oraz sVEGFR-2) i są uważane za fizjologiczne inhibitory procesów angiogenezy i neoangiogenezy ponieważ wiążą VEGF-A zanim dotrze do receptorów związanych z błoną na powierzchni komórek [53].

Aktualne badania wskazują, że angiogeneza ma kluczowe znaczenie w patogenezie wielu nowotworów, a zwiększona ekspresja jej markerów została skorelowana z cechami klinicznymi oraz jest czynnikiem złego rokowania [54]. Również w przypadku raka piersi VEGF jest znacznie podwyższony. W porównaniu z prawidłowymi tkankami piersi tkanki raka piersi wykazywały wyższą ekspresję VEGF. Około 72–98% przypadków raka piersi jest dodatnich pod względem VEGF w badaniu immunohistochemicznym. Ekspresja VEGF w guzach piersi jest skorelowana z dużymi rozmiarami, wysokim stopniem złośliwości histologicznej, brakiem ekspresji receptora estrogenowego, brakiem ekspresji receptora progesteronowego, nadekspresją receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 oraz przerzutami do węzłów chłonnych [55, 56].

Terapia anty-VEGF z użyciem humanizowanego przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko VEGF w połączeniu z chemioterapią, wykazuje poprawę przeżycia wolnego od progresji u kobiet z przerzutowym rakiem piersi. Dodatkowo zwiększona ekspresja VEGF jest związana z nabytą opornością na estrogeny *in vitro*. Ekspresja VEGF może być także uważana za negatywny czynnik prognostyczny w inwazyjnym raku piersi [55, 56].

Jednym z czynników prowadzących do wystąpienia angiogenego fenotypu w nowotworach może być nadmierna ekspresja czynnika tkankowego (TF, ang. tissue factor). Proces ten wpływa zarówno na regulację w górę ekspresji proangiogenego VEGF jak i regulację w dół ekspresji trombospondyny, czyli białka antyangiogenego. Ponadto niektóre czynniki transkrypcyjne są zaangażowane zarówno w regulację ekspresji TF jak i VEGF. Zgromadzone dane wskazują, że TF wyrażany przez komórki nowotworowe, jak również komórki gospodarza, inicjuje bezpośrednie lub pośrednie zdarzenia sygnalizacyjne, które wspierają angiogenezę nowotworu. Dodatkowo aktywacja kaskady krzepnięcia wytwarza fragmenty proteolityczne proteaz, inhibitory oraz składniki macierzy zewnątrzkomórkowej o silnym wpływie pobudzającym neoangiogenezę [54].

2.2.2. Waskulogeneza

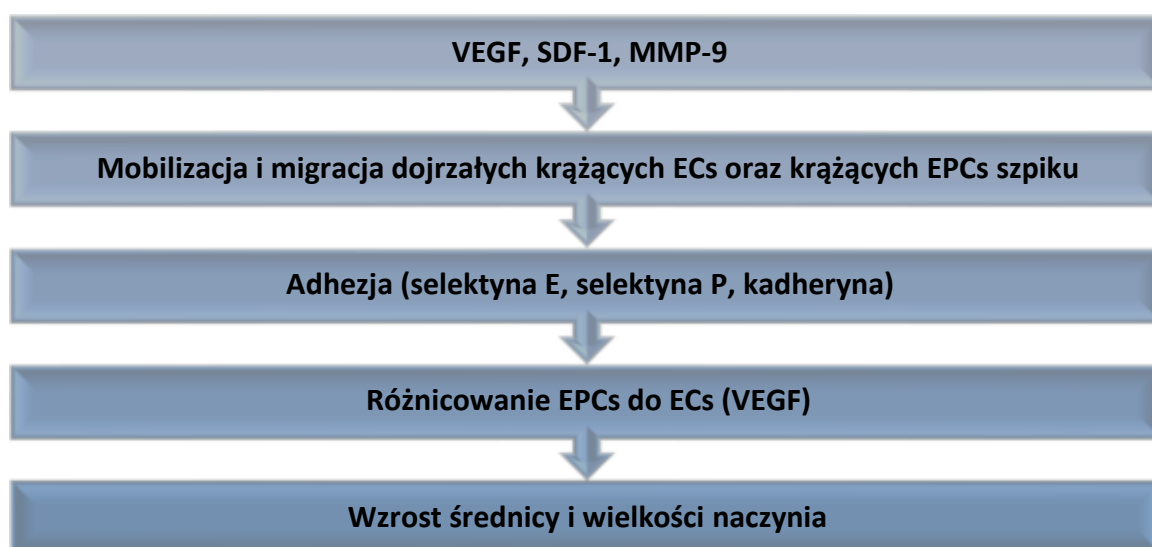
Waskulogeneza zachodzi przede wszystkim podczas życia płodowego oraz gojenia ran. Jest również jednym z podstawowych mechanizmów powstawania naczyń krwionośnych w nowotworach. Proces ten obejmuje tworzenie się naczyń krwionośnych de novo z komórek progenitorowych śródbłonka (EPCs, ang. endothelial progenitor cells) pochodzących ze szpiku kostnego, które znajdują się w krążeniu obwodowym i migrują do miejsc uszkodzonych naczyń w celu współtworzenia nowych naczyń krwionośnych [48, 52].

Możemy wyróżnić wczesne EPCs oraz późne EPCs, które biorą udział w innych etapach powstawania nowych naczyń krwionośnych. Za wydzielanie szeregu proangiogennych czynników wzrostu i cytokin takich jak VEGF, czynnik pochodzenia zrębowego 1 (SDF-1, ang. stromal cell-derived factor 1), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (GM-CSF, ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1, ang. insulin-like growth factor 1), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, ang. hepatocyte growth factor) oraz interleukina 8 (IL-8, ang. interleukin 8) odpowiadają głównie wczesne EPCs. Czynniki te zwiększają proliferację i przeżycie ECs oraz kierują rekrutację endogennych komórek progenitorowych do miejsc powstających naczyń. Dodatkowo wczesne EPCs posiadają liczne cechy komórek śródbłonka, takie jak obecność markerów CD31, CD133, CD34 i VEGFR-2, podczas gdy późne EPCs wyrażają E-kadherynę, czynnik von Willebranda (vWF, ang. von Willebrand factor) a także markery śródbłonkowe, takie jak CD31, CD34 i VEGFR-2. Wykazano, że późne EPCs podczas hodowli in vitro łączonych z dojrzałymi komórkami śródbłonka mogą infiltrować rozwiniętą sieć naczyniową oraz przyczyniają się do tworzenia sieci naczyniowej in vivo poprzez waskulogenezę zapewniając głównie wsparcie strukturalne w wyniku różnicowania w dojrzałe EC. Ponadto późne EPCs mogą również promować angiogenezę poprzez wydzielanie VEGF, IL-8, IL-10, interleukiny 18 (IL-18, ang. interleukin 18) oraz erytropoetyny (EPO, ang. erythropoietin) jednak w znacznie mniejszym stopniu niż wczesne EPCs [57, 58].

Coraz więcej dowodów sugeruje, że wczesne i późne EPCs odgrywają kluczową rolę w angiogenezie pourodzeniowej oraz waskulogenezie w wielu stanach patologicznych, takich jak niedokrwienie i zawał mięśnia sercowego, gojenie ran, miażdżyca, niedokrwienie kończyn i rozwój nowotworu. Dlatego w leczeniu chorób, takich jak guzy łagodne, EPCs uznano za interesujący cel terapeutyczny ściśle związany z neowaskularyzacją [57].

Istnieją dowody sugerujące, że proces unaczynienia guza może być częstszy i/lub istotny we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu, ponieważ hamowanie mobilizacji komórek macierzystych lub prekursorowych komórek śródbłonna zapobiega indukowaniu początkowej odpowiedzi angiogennej [48, 59]. Dodatkowo początkowa liczba krążących EPCs może być istotnym markerem prognostycznym w raku piersi [59].

Rekrutacja EPCs podczas progresji guza znacząco przyczynia się do tworzenia nowych naczyń nowotworowych związanych z rakiem. Waskulogeneza za pośrednictwem EPCs obejmuje: mobilizację EPCs ze szpiku kostnego, aktywne zatrzymanie i przezśródbłonkowe wynaczynienie EPCs do przestrzeni śródmiąższowej rosnącego guza oraz włączenie EPCs do nowych naczyń lub parakrynnego nośnika powstającego mikronaczyń – Rycina 20 [52].



Rycina 20. Etapy waskulogenezy w procesie nowotworowym (rycina własna) [52].

Wysokie stężenie VEGF wytwarzane przez komórki nowotworowe mobilizuje rezydentne EPCs szpiku kostnego do wejścia do krążenia obwodowego i zwiększa rekrutację tych komórek do mikrośrodowiska guza. VEGF mobilizuje te komórki poprzez interakcję z receptorami VEGFR-1 i VEGFR-2, które ulegają ekspresji na EPCs [60].

W warunkach klinicznych wyższa liczba krążących EPCs we krwi obwodowej chorych na nowotwory koreluje ze zwiększoną angiogenezą i tworzeniem przerzutów, a także wiąże się ze skróceniem całkowitego przeżycia. Wśród pacjentów z rakiem piersi, płuca, żołądka, wątroby oraz glejakiem wielopostaciowym stwierdzono wyższą liczbę krążących EPCs w porównaniu z osobami zdrowymi. Również podczas rozwoju raka piersi komórki

progenitorowe śródbłónka są mobilizowane ze względu na ich wysoki potencjał proliferacyjny. Ulegają rekrutacji podczas transformacji nowotworowej ułatwiając wzrost i powstawanie przerzutów nowotworowych [60]. Jednak badania są niejednoznaczne i wskazują, że również niska liczba krążących EPCs może się wiązać z niekorzystnym rokowaniem. W przypadku raka piersi komórki nowotworowe mobilizują EPCs w ściśle ograniczony sposób, do momentu gdy nowotwór osiąga fazę plateau wzrostu, a udział EPCs nie jest już wymagany [59].

2.3. Stan prozakrzepowy

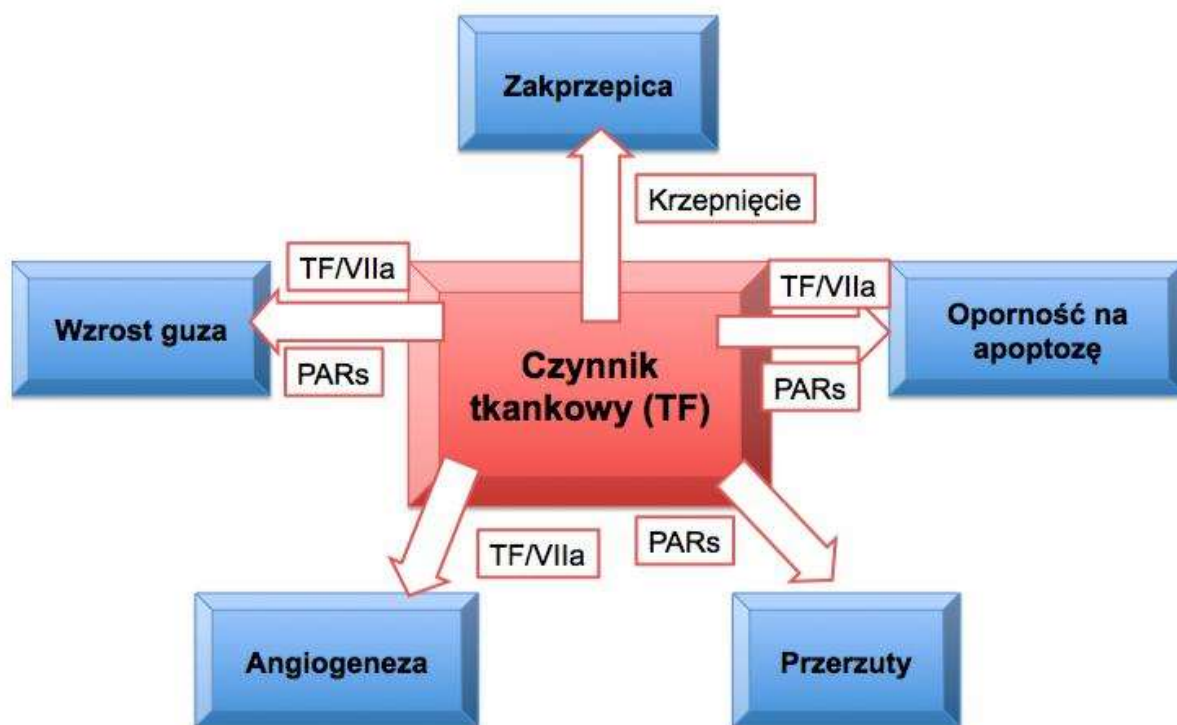
Kaskada krzepnięcia to system obronny gospodarza, który utrzymuje integralność zamkniętego układu krążenia [61]. Aby zapobiec nadmiernej utracie krwi, zaangażowany jest układ hemostatyczny, który obejmuje białka krzepnięcia osocza, płytki krwi, komórki śródbłónka naczyniowego, inhibitory krzepnięcia oraz aktywatory i inhibitory fibrynolizy [62].

Czynnik tkankowy (TF) jest białkiem transbłonowym ulegającym stosunkowo wysokiej ekspresji w zewnętrznej warstwie ściany naczyń krwionośnych, komórkach astrogleju, ośrodkowym układzie nerwowym, płucach oraz łożysku. Dodatkowo po stymulacji przez cytokiny prozapalne m.in. monocyty i makrofagi wykazują ekspresję TF na swojej powierzchni. Ekspresja TF występuje również na komórkach nowotworowych i jest związana z potencjałem przerzutowym tych komórek [63].

Zgodnie z modelem komórkowym krzepnięcia, inicjacja koagulacji następuje, gdy krew jest wystawiona na działanie TF, ulegającego ekspresji na fibroblastach warstwy podśródbłonkowej. TF wiąże się następnie z czynnikiem VII prowadząc do jego aktywacji. Jeśli działający bodziec jest wystarczająco silny, aktywowane są dalsze czynniki krzepnięcia, co powoduje powstawanie trombiny generowanej przez enzymatyczne rozszczepienie protrombiny [64]. Trombina aktywuje również szlak wzmacniający kaskadę krzepnięcia zwany szlakiem wewnątrzpochodnym, który może dalej zwiększać tworzenie fibryny. Dodatkowo trombina jest najsilniejszym aktywatorem płytek krwi, a aktywowane płytki krwi mają tendencję do przylegania do fibryny i tworzenia agregatów płytek krwi, które przyczyniają się do tworzenia skrzepliny [61].

Oprócz regulacji kaskady krzepnięcia w ostatnich latach wykazano, że TF uczestniczy w różnych procesach biologicznych innych niż hemostaza, w tym w embriogenezie, zapaleniu, sygnalizacji komórkowej, migracji komórek, wzroście guza, przerzutach i angiogenezie.

Ponadto, ostatnie badania wykazały, że aktywność wewnątrzkomórkowa indukowana przez FVII(a) związany z powierzchnią komórki TF może być powiązana z tymi zdarzeniami. Ponadto TF może często odgrywać swoją rolę niezależnie od wiązania się ze swoim naturalnym ligandem czyli FVII(a) [54]. Rycina 21 przedstawia udział czynnika tkankowego w wybranych procesach biologicznych.



Rycina 21. Udział czynnika tkankowego w wybranych procesach biologicznych na podstawie López-Pedrerera i wsp. [54].

Dodatkowym zagrożeniem związanym z nowotworem jest stan prozakrzepowy. Nasilenie krzepnięcia jest powiązane z transformacją nowotworową poprzez wpływ na wzrost komórek nowotworowych, migrację, angiogenezę oraz wynacznienie [42]. Układ hemostatyczny u pacjentów z nowotworem często ulega deregulacji, co prowadzi do zagrażających życiu żylnych zdarzeń zakrzepowych [62]. W rzeczywistości 15% wszystkich pacjentów z nowotworami rozwija epizod zakrzepowy. Czynniki ryzyka wpływające na wystąpienie zakrzepicy to obecność zaawansowanej choroby, lokalizacja nowotworu, zastosowanie cewnika centralnego, chemioterapia, typ histologiczny oraz choroby współistniejące, szczególnie nadciśnienie, cukrzyca i otyłość [63]. Powikłania żylnych choroby zakrzepowo-zatorowej, w tym zatorowość płucna, są drugą najczęstszą przyczyną zgonów pacjentów z nowotworem, przy czym ryzyko żylnych choroby zakrzepowo-zatorowej jest

zwiększone od 7 do nawet 28 razy u pacjentów z nowotworem w porównaniu z pacjentami bez choroby nowotworowej. Ta zmienność ryzyka jest skorelowana m. in. z rodzajem nowotworu złośliwego, danymi demograficznymi pacjenta oraz zastosowanym schematem leczenia [62].

Wśród pacjentów z rakiem odnotowano nadekspresję TF i trombiny. Co ciekawe, TF może być również uwalniany pod wpływem TNF- α i IL-1 w postaci rozpuszczalnej. Z drugiej strony komórki nowotworowe wytwarzają TNF- α i IL-1, które aktywują proangiogenne czynniki wzrostu, powodując zwiększony wzrost masy guza [42]. Dodatkowo w nowotworach czynnikiem aktywującym TF może być heparanaza, która z kolei może być uwalniana z płytek krwi w odpowiedzi na działanie trombiny [61]. Tak więc proces nowotworowy, stan zapalny, stan prokoagulacyjny oraz zmiany aktywności enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej są ze sobą nierozdzielnie związane, tworząc „maszynę z własnym zasilaniem” [42, 61].

Nadekspresja TF w guzach litych jest niezależnym predyktorem krótszego całkowitego przeżycia oraz przeżycia bez nawrotu choroby. W raku piersi stężenie TF może być również wczesnym markerem diagnostycznym [56]. Obecnie dobrze wiadomo, że TF oprócz inicjowania procesu krzepnięcia wykazuje również dodatkowe funkcje biologiczne. Wykazano, że komórki nowotworowe z nadekspresją TF charakteryzują się zwiększoną ekspresją VEGF. W przypadku raka piersi, płuca i jelita grubego wykazano dodatnią zależność pomiędzy ekspresją TF a wysoką gęstością mikronaczyń i ekspresją VEGF w korelacji ze zmniejszoną przeżywalnością. Badania te wskazują na związek, ale nie bezpośrednią rolę TF w angiogenezie. Dodatkowo inaktywacja genu TF powoduje powstawanie patologicznego systemu krążenia i dezorganizację ściany naczyń w zarodkach, co oznacza, że TF ma wpływ na rozwój naczyń krwionośnych podczas embriogenezy [61].

2.4. Macierz zewnątrzkomórkowa

Macierz zewnątrzkomórkowa to niekomórkowa, makrocząsteczkowa, trójwymiarowa sieć złożona przede wszystkim z kolagenów, proteoglikanów, elastyny, fibronektyny, laminin i kilku innych glikoprotein. Składniki macierzy wiążą się ze sobą, podobnie jak receptory adhezji komórkowej, tworząc złożoną sieć, w której znajdują się komórki wszystkich tkanek i narządów [64]. Przez lata uważano, że macierz zewnątrzkomórkowa stanowi jedynie swoiste rusztowanie, na którym organizowane są tkanki. W rzeczywistości receptory powierzchniowe

m.in. fibroblastów oraz komórek układu immunologicznego przekazują sygnały pochodzące z ECM do wnętrza komórek. Tym samym ECM reguluje różne funkcje komórkowe dostarczając istotnych biochemicznych i biomechanicznych wskazówek, które kierują wzrostem, przeżyciem, migracją i różnicowaniem komórek. Ponadto sygnały te modulują rozwój naczyń oraz są niezbędne do utrzymania prawidłowej homeostazy i funkcji immunologicznych [64-67]. Dodatkowo ECM stanowi ważny rezerwuar wielu białek związanych z jej przebudową. Białka te to czynniki wzrostu, cytokiny, chemokiny, mucyny, lektyny typu C, galektyny, semaforyny, pleksyny oraz enzymy modyfikujące ECM takie jak heparanaza, transglutaminaza, oksydaza lizylowa i hydroksylaza. Degradacja cząsteczek macierzy zewnątrzkomórkowej prowadzi do lokalnego uwalniania związanych czynników wzrostu i aktywowania wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych [64, 68].

Macierz zewnątrzkomórkową można podzielić na dwa główne typy różniące się lokalizacją i składem: macierz śródmiąższową tkanki łącznej oraz wysoce wyspecjalizowane macierze specyficzne narządowo lub specyficzne dla tkanki, takie jak błony podstawne oddzielające nabłonek od otaczającego zrębu [68, 69].

Równowaga między degradacją a tworzeniem ECM jest odpowiedzialna m.in. za homeostazę napięcia i właściwości każdego narządu, takie jak elastyczność i wytrzymałość na ściskanie oraz rozciąganie [70]. Natomiast deregulacja składu i struktury ECM może wiązać się z rozwojem i progresją stanów patologicznych [64, 67, 71]. Skutkiem odziedziczonych lub nabytych wad budowy, sztywności i składu ECM może być przewlekły stan zapalny, choroby autoimmunologiczne, czy też choroba nowotworowa [67, 71].

2.4.1. Budowa macierzy zewnątrzkomórkowej

Każdy narząd ze względu na specyficzną dla danej tkanki rolę, pełnioną w organizmie ma unikalny skład i budowę ECM. Zasadniczo ECM jest skomplikowaną siecią składającą się z wody, minerałów i około 300 białek, takich jak: kolageny, glikoproteiny i proteoglikany [66, 68, 70].

Jedną z grup białek tworzących ECM stanowią proteoglikany siarczanu heparanu (HSPG, ang. heparan sulfate proteoglycan). Są to glikoproteiny, które zawierają jeden lub więcej kowalencyjnie przyłączonych łańcuchów siarczanu heparanu (HS, ang. heparan sulfate). Wyróżniamy ok. 17 proteoglikanów siarczanu heparanu, które można podzielić na

trzy grupy w zależności od lokalizacji: HSPG błonowe (syndekany i glikikany), HSPG macierzy zewnątrzkomórkowej (agryna, perlekan, kolagen typu XVIII) oraz HSPG pęcherzyka wydzielniczego (serglycyna) [72].

Ze względu na wiązanie przez siarczan heparanu licznych białek oraz aktywność HSPG jako receptorów i koreceptorów oddziałują one z wieloma ligandami przez co mają istotny wpływ na procesy zachodzące zarówno na poziomie komórkowym i tkankowym, jak również na poziomie całego organizmu – Rycina 22 [72]. Funkcje HSPG zarówno w procesach fizjologicznych jak i patologicznych mogą być modulowane przez aktywność heparanazy [73].



Rycina 22. Procesy, w których pośredniczą proteoglikany siarczanu heparanu na podstawie Sarrazin i wsp. [72].

2.4.2. Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej

Zarówno degradacja jak i obrót macierzy zewnątrzkomórkowej jest ważną częścią homeostazy. Zbyt mała lub zbyt duża degradacja może prowadzić odpowiednio do zwłóknienia lub uszkodzenia tkanek. Rozszczepienie cząsteczek macierzy może lokalnie uwalniać związane czynniki wzrostu i aktywować wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne. Również kationy dwuwartościowe, takie jak kationy wapnia, mogą być uwalniane podczas przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, ułatwiając transport wapnia przez błonę i potencjalnie modulując aktywność zależnych od wapnia, zawierających cynk endopeptydaz [69].

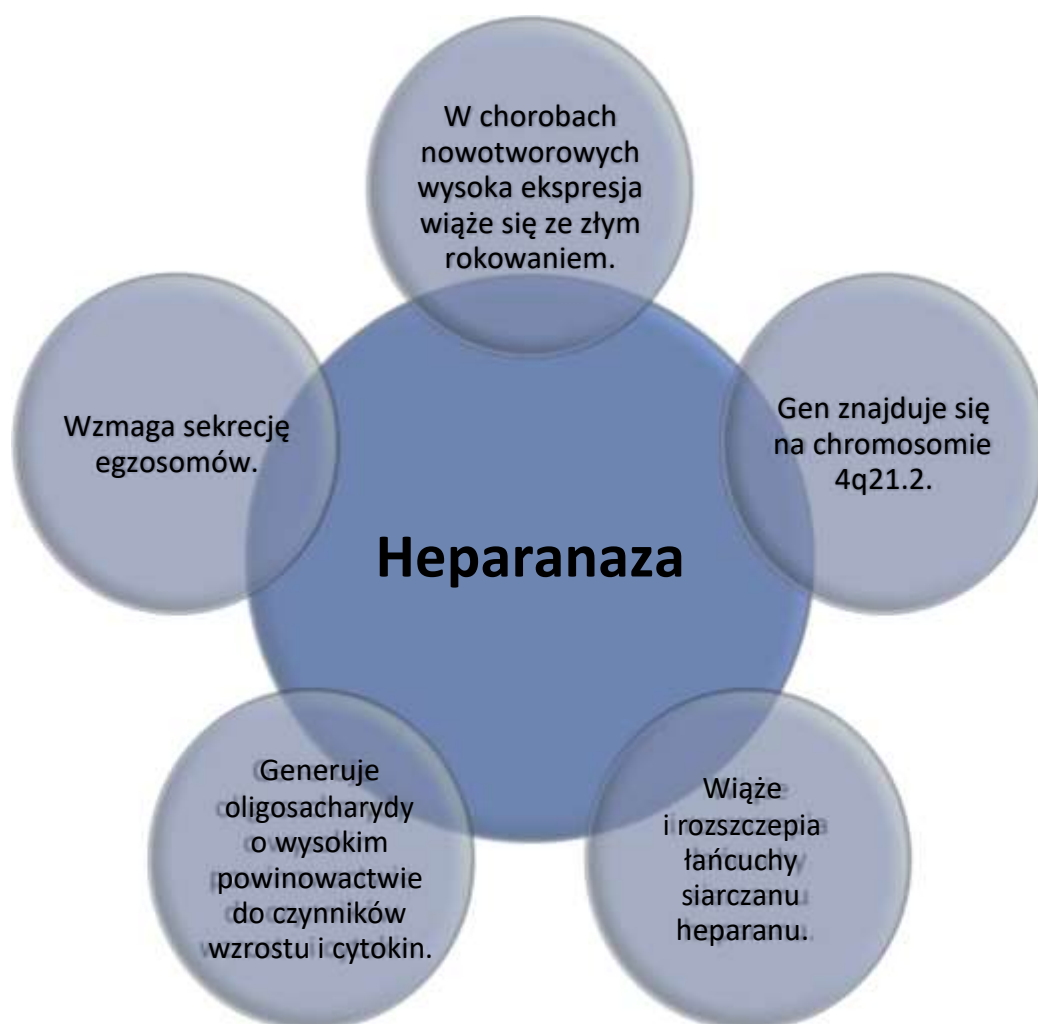
Ze względu na spektrum degradowanych białek enzymy ECM możemy podzielić na dwie grupy. Wyróżniamy enzymy degradujące wiele, różnych strukturalnie białek ECM np. metaloproteinazy macierzy (MMP, ang. matrix metalloproteinases), adamalizyny (ADAMs, ang. adamalysins) oraz enzymy degradujące jedynie wybraną grupę białek np. heparanaza [69].

Podwyższony obrót ECM w nowotworach powoduje szybką degradację „prawidłowej” macierzy, ułatwiając jej zastąpienie macierzą nowotworową, która wzmacnia agresywne cechy komórek nowotworowych [69]. Degradacja ECM jest jednym z warunków migracji komórek nowotworowych oraz powstawania przerzutów. Heparanaza jest przykładem enzymu ECM, który w wyniku degradacji białek ECM oprócz usunięcia bariery mechanicznej uwalnia również liczne czynniki wzrostu, które promują rozwój nowotworu [73].

3. Heparanaza

Heparanaza będąca endo-B-D-glukuronidazą to jedyny enzym ssaków rozszczepiający siarczan heparanu [74, 75]. Po raz pierwszy opisana w 1952 roku jako heparynaza ze względu na jej funkcję rozszczepiania heparyny [76].

Wykazuje dwie aktywności: enzymatyczną i nieenzymatyczną, przy czym obie funkcje wpływają na zmniejszenie integralności strukturalnej błony podstawnej i ECM. Aktywność heparanazy prowadzi również do uwalniania czynników wzrostu i cytokin związanych z siarczanem heparanu. Fizjologicznie ekspresja heparanazy ograniczona jest do kilku typów komórek i tkanek takich jak płytki krwi, komórki układu immunologicznego, czy łożyska [74]. Na Rycinie 23 przedstawiono główne cechy heparanazy.



Rycina 23. Główne cechy heparanazy [73].

3.1. Budowa heparanazy

Heparanaza syntetyzowana jest jako pre-proenzym, składający się z: domeny peptydu sygnałowego, domeny o masie 8 kDa, regionu łącznikowego o masie 6 kDa oraz domeny o masie 50 kDa. W wyniku usunięcia domeny peptydu sygnałowego pre-proenzym ulega przekształceniu w proenzym. Następnie w wyniku wycięcia regionu łącznikowego powstaje heterodimer składający się z domeny o masie 8 kDa oraz domeny o masie 50 kDa, który stanowi aktywną postać enzymu [76]. Rycina 24 przedstawia proces biogenezy aktywnej postaci heparanazy, na czerwono zostały zaznaczone miejsca aktywne enzymu.

Pre-proheparanaza



Proheparanaza



Aktywna heparanaza



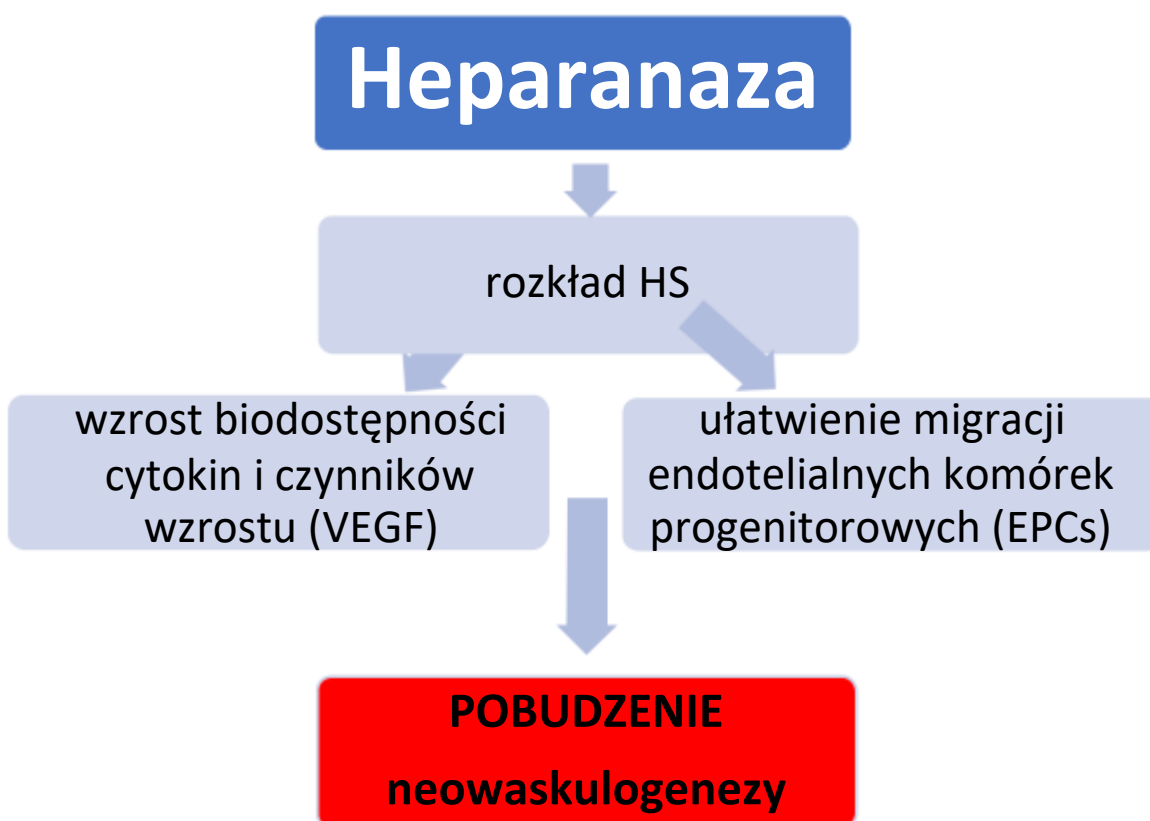
Rycina 24. Biogeneza heparanazy na podstawie Hulett i wsp. [76].

3.2. Aktywność enzymatyczna

Podstawową funkcją enzymatyczną heparanazy jest rozkład siarczanu heparanu (HS), silnie usiarczanowanego polisacharydu znajdującego się w ECM oraz na powierzchni komórek ssaków [75, 76]. Rozkład siarczanu heparanu przez heparanazę reguluje biodostępność białek z nim związanych, stymuluje mikrośrodowisko guza i ułatwia rozprzestrzenianie się inwazyjnych komórek nowotworowych i zapalnych – Rycina 25 [75].

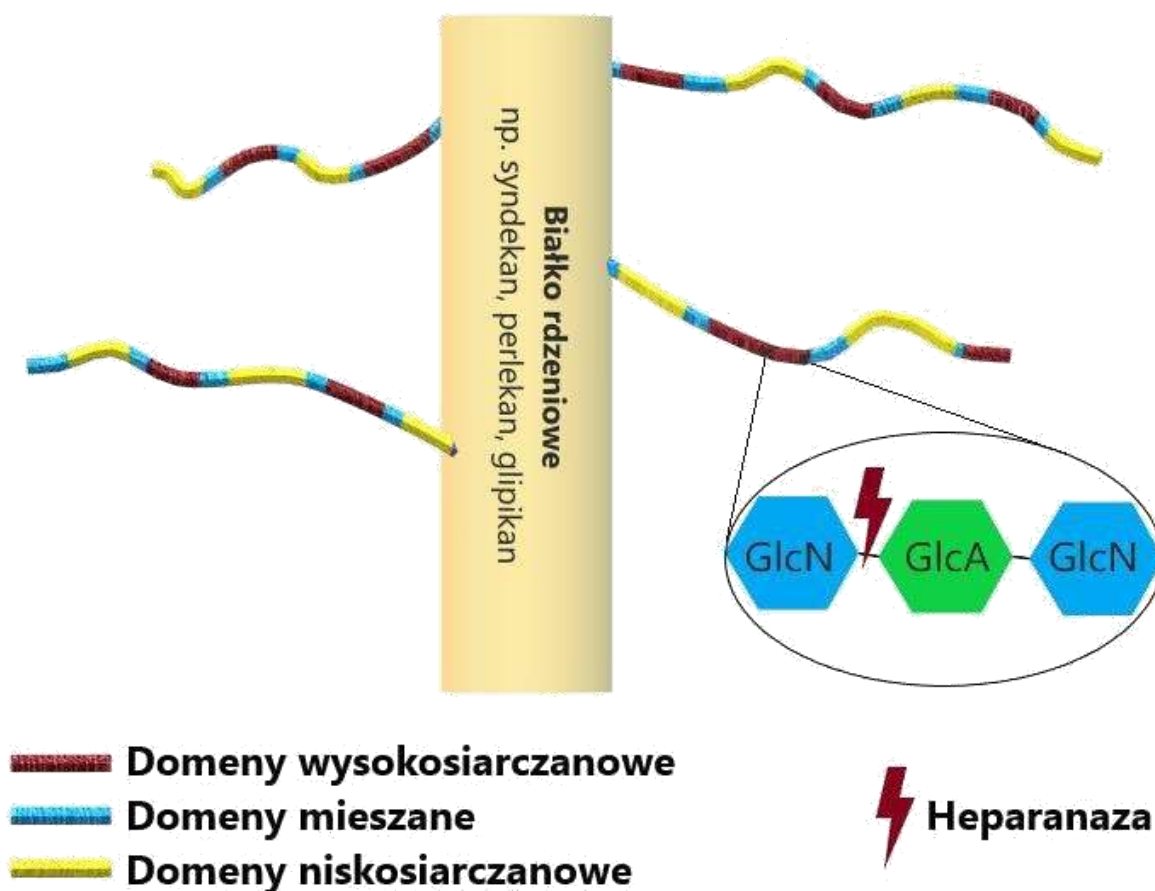
Macierz zewnątrzkomórkowa składa się z około 300 białek, przy czym 36 z nich to proteoglikany, w tym proteoglikany siarczanu heparanu. Generalnie HSPG zawierają od jednego do czterech łańcuchów HS, składających się z kwasu glukuronowego/iduronowego i disacharydu glukozaminy. Jednostki disacharydowe kwasu glukuronowego/iduronowego

i glukozaminy dzielą wiązanie 1 → 4 i umożliwiają N- i O- siarczanowanie oraz acetylowanie reszt, w wyniku czego łańcuchy HS są jednymi z najbardziej ujemnie naładowanych biopolimerów. Różnorodność w budowie i charakterze anionowym umożliwia łańcuchom HS działanie jako rezerwuar macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez wiązanie się z około 300 różnymi białkami, w tym czynnikami wzrostu, cytokinami i enzymami [77].



Rycina 25. Aktywność enzymatyczna heparanazy na przykładzie neowaskulogenezy (rycina własna) [75].

Tylko wybrane miejsca w łańcuchu HS są podatne na rozszczepienie za pośrednictwem heparanazy [78]. Zaobserwowano, że rozszczepienie HS za pośrednictwem heparanazy skutkuje powstaniem oligosacharydów o masie ok. 5–12 kDa oraz łańcuchów o pośredniej wielkości między początkowym substratem a całkowicie zdepolimeryzowanym HS [69, 77, 78]. Dodatkowo uzyskane łańcuchy oligosacharydowe są odporne na dalszą hydrolizę przez heparanazę [78].



Rycina 26. Budowa przykładowego proteoglikanu siarczanu heparanu wraz ze wskazaniem miejsca potencjalnego działania heparanazy na podstawie Wu i wsp. [78].

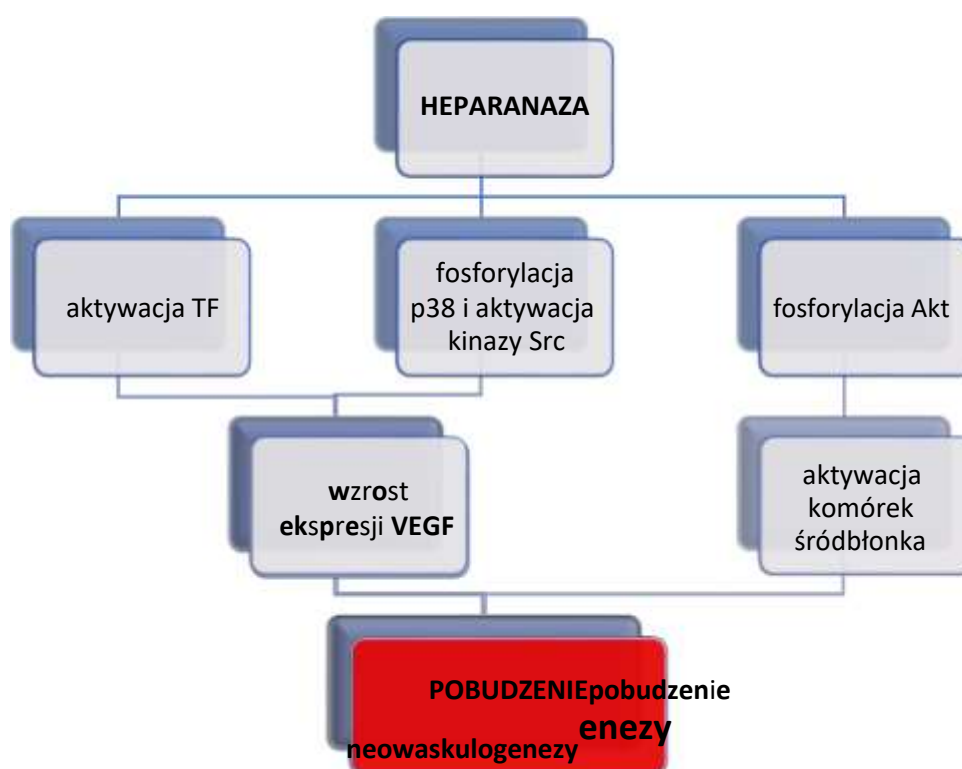
Badania sugerują, że heparanaza nie rozpoznaje określonych sekwencji monosacharydów a raczej pewne wzorce usiarczanowania. Hydrolizie ulega część wewnętrznych wiązań glikozydowych reszt GlcA, a cięcie zachodzi po nieredukującej stronie silnie siarczanowanych domen [75]. Minimalną rozpoznawaną sekwencją jest trisacharyd [75, 77], taki jak -GlcN-GlcA-GlcN- znajdujący się w silnie usiarczanowanym regionie (Rycina 26) lub sekwencja -GlcA-GlcNS- w zależności od proksymalnej obecności łańcucha -GlcA2S-GlcN [77].

3.3. Aktywność nieenzymatyczna

Heparanaza pośredniczy w adhezji komórek również niezależnie od jej aktywności enzymatycznej. Nadekspresja heparanazy w komórkach mysiego chłoniaka Eb powodowała ich adhezję do ECM lub do pojedynczych warstw komórek śródbłonka. Na adhezję nie wpływał

siarczan laminaryny będący silnym inhibitorem aktywności enzymatycznej heparanazy. Ponadto zwiększoną adhezję komórek obserwowano również gdy zastosowano zmutowaną pozbawioną aktywności enzymatycznej heparanazę [79].

Jedną z podstawowych funkcji heparanazy jest dezintegracja macierzy zewnątrzkomórkowej, a tym samym ułatwienie naciekania tkanek przez komórki nowotworowe. Jednak rola heparanazy jest znacznie szersza ponieważ zarówno aktywna, jak i nieaktywna enzymatycznie heparanaza promuje przekazywanie sygnału, w tym sygnalizację poprzez liczne receptory, co podkreśla znaczenie nieenzymatycznej aktywności heparanazy w progresji nowotworów [80].



Rycina 27. Aktywność nieenzymatycznej heparanazy na przykładzie neowaskulogenezy (rycina własna) [77, 79, 81].

Nieenzymatyczne działanie heparanazy stymuluje migrację i inwazję komórek śródbłonna w sposób zależny od kinazy fosfatydyloinozytolu [79]. Heparanaza jest również kofaktorem czynnika tkankowego (TF), a jej aktywność nieenzymatyczna skutkuje wzmocnieniem aktywności układu krzepnięcia. Wyższa biodostępność TF jest związana z produkcją trombiny i odkładaniem fibryny. Natomiast trombina aktywuje płytki krwi, które uwalniają heparanazę. TF wpływa również na uwalnianie VEGF z komórek śródbłonna. Zatem

heparanaza bezpośrednio prowadzi do nadkrzepliwości oraz stymuluje neowaskularyzację poprzez regulację ekspresji i/lub aktywności zarówno TF jak i VEGF – Rycina 27 [81].

3.4. Udział heparanazy w procesach fizjologicznych

Prawidłowe działanie heparanazy jest niezbędne do przebiegu licznych procesów fizjologicznych obejmujących przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej [78]. Wydaje się być zaangażowana w implantację i rozwój zarodka, gojenie ran, przebudowę tkanek, nadzór immunologiczny i wzrost włosów [79]. Wykazano, że heparanaza pośredniczy w procesach, odgrywających kluczową rolę w adhezji, migracji i inwazji różnych typów komórek. Niedawno stwierdzono również, że heparanaza reguluje produkcję egzosomów oraz proces autofagi. Wewnątrzkomórkowa heparanaza może lokalizować się w autofagosomach, gdzie pozytywnie stymuluje proces autofagiczny poprzez mechanizm nieenzymatyczny obejmujący regulację w dół aktywności kinazy mTOR1 [82].

Badania nad ekspresją heparanazy w komórkach układu immunologicznego wykazały wysoki poziom konstytutywnej oraz indukowalnej ekspresji w płytkach krwi, monocytach, makrofagach, neutrofilach, komórkach tucznych, komórkach dendrytycznych, aktywowanych limfocytach i eozynofilach [76, 82]. Natomiast w przypadku węzłów chłonnych, szpiku kostnego, śledziony, wątroby i grasicy obserwowano niższe poziomy ekspresji heparanazy. Dane te wskazują na kluczową rolę heparanazy w prawidłowym funkcjonowaniu układu immunologicznego [76]. Stwierdzono również jej konstytutywną aktywność w trofoblastach i keratynocytach [82].

W większości ludzkich tkanek innych niż komórki układu immunologicznego ekspresja heparanazy jest niska lub niewykrywalna. Dotyczy to w szczególności nerek, trzustki, serca, mózgu, endometrium, płuc, jąder, tchawicy, okrężnicy, nadnerczy, gruczołów ślinowych oraz mięśni szkieletowych [76]. Promotor heparanazy w prawidłowych komórkach i tkankach jest konstytutywnie wyciszany przez metylację i działanie białka p53 [82].

Ekspresja heparanazy może być również indukowana przez reaktywne formy tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species), składniki układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA, ang. renin-angiotensin-aldosterone system), endotelinę 1, glukozę, estrogeny, niektóre warianty białka p53 i mediatory zapalne, takie jak IL-1 β , TNF α i NF kappa B (NF-kB, ang. Nuclear Factor kappa B). Natomiast tlenek azotu hamuje wytwarzanie heparanazy

podobnie jak przeciwzapalne przekazywanie sygnałów wewnątrzkomórkowych poprzez receptor witaminy D [82].

3.5. Udział heparanazy w stanach patologicznych

Większość badań dotyczących heparanazy skupia się na jej roli w przebiegu choroby nowotworowej, a w szczególności w promowaniu przerzutów poprzez enzymatyczną degradację macierzy zewnątrzkomórkowej [83]. Jednak heparanaza jest zaangażowana i odgrywa istotną rolę również w chorobach takich jak: cukrzyca typu 1 [84], choroby sercowo-naczyniowe, stwardnienie rozsiane, choroba prionowa oraz kłębuszkowe zapalenie nerek [82]. Regulując biodostępność HS, heparanaza bierze także udział w patogenezie zaburzeń wywołanych przez wirusy [83]. Tabela 11 przedstawia mechanizmy działania heparanazy w wybranych jednostkach chorobowych.

Tabela 11. Mechanizmy działania heparanazy w wybranych jednostkach chorobowych [82-84].

Jednostka chorobowa	Mechanizm działania heparanazy	Piśmiennictwo
Choroby sercowo-naczyniowe	Stanowi krytyczny mediator zakrzepicy po angioplastyce i zaburzeniach przepływu wywołanych przez stent. Wzmaga mineralizację i różnicowanie osteogenne komórek mięśni gładkich naczyń. Jest związana z różnicowaniem osteoklastów wywołanym zapaleniem i aktywnością w zaawansowanych blaszkach miażdżycowych.	[82]
Choroby układu nerwowego	Moduluje migrację leukocytów przez barierę krew-mózg. Przyczynia się do powstawania zmian neurozapalnych.	[82]
Infekcje wirusowe	Umożliwia uwolnienie cząstek wirusa do środowiska zewnątrzkomórkowego lub sąsiednich komórek.	[83]
Cukrzyca typu 1	Zwiększa migrację i inwazję leukocytów do wysepek trzustkowych. Powoduje uszkodzenie i śmierć komórek beta trzustki.	[84]

3.6. Heparanaza w nowotworach

Znaczący wzrost zainteresowania heparanazą rozpoczął się w latach 80. XX wieku. Stwierdzono wtedy w przerzutowych komórkach czerniaka B16 obecność endoglikozydazy specyficznej wobec HS, która uwalniała fragmenty HS z ECM hodowanych komórek śródbłonna naczyniowego. Bardzo istotne było również stwierdzenie dodatkowej zależności pomiędzy zawartością tego enzymu w różnych podliniach czerniaka B16 a ich potencjałem przerzutowym [85]. Po wielu latach badań i analiz wiemy, że we wszystkich najczęściej występujących nowotworach ekspresja heparanazy jest podwyższona [69, 86]. Ponadto enzym ten przyspiesza progresję wielu nowotworów i wiąże się ze złym rokowaniem [69, 87]. W związku z tym ze względu na swój wieloaspektowy charakter, heparanaza stała się kluczowym elementem regulacyjnym w ramach mikrośrodowiska guza.

Najnowsze dane uzyskane m.in. podczas badań inhibitorów heparanazy wskazują jednak na możliwość podwójnej roli heparanazy zarówno w promowaniu jak i hamowaniu wzrostu nowotworu – Rycina 28 [74].



Rycina 28. Rola heparanazy w procesie nowotworowym (rycina własna) [74].

3.6.1. Działanie przeciwnowotworowe heparanazy

Na podstawie licznych badań oraz obserwacji heparanazie przypisywana jest głównie rola promotora rozwoju i progresji nowotworu. Jednak dane opublikowane w ostatnich latach mogą wskazywać również na jej przeciwnowotworową rolę poprzez regulacje aktywności komórek NK i limfocytów T zawierających chimeryczny receptor antygenowy (CAR-T, ang. chimeric antigen receptors T cells) [74].

Komórki NK stanowią silne zabezpieczenie przed rozwojem nowotworu i przerzutów oraz odgrywają kluczową rolę w immunonadzorowaniu nowotworów [74]. Badania wykazały, że heparanaza ma kluczowe znaczenie w aktywności przeciwnowotworowej układu immunologicznego, w której pośredniczą komórki NK. Początkowe stężenia heparanazy w świeżo wyizolowanych ludzkich oraz mysich komórkach NK były niskie. Jednak po aktywacji tych komórek dochodziło do wzrostu stężenia heparanazy. Dodatkowo u myszy pozbawionych ekspresji heparanazy w szczególności w komórkach NK ($Hpse^{fl/fl}$ NKp46-iCre) stwierdzono upośledzoną inwazję i nadzór nad nowotworem. Myszy te po zaszczepieniu liniami komórkowymi raka sutka w porównaniu do grupy kontrolnej były również bardziej podatne na rozwój nowotworu. Od obecności heparanazy ściśle zależała migracja komórek NK do guzów pierwotnych oraz ich rekrutacja do miejsca przerzutu [88].

Kolejną grupą komórek, której aktywność przeciwnowotworowa zależy od heparanazy są limfocyty T zawierające chimeryczny receptor antygenowy. Komórki CAR-T hodowane *in vitro* składają się głównie z limfocytów pamięciowych i efektorowych charakteryzujących się silną funkcją cytotoksyczną. Jednak aby wykorzystać swoją funkcję efektorową komórki CAR-T muszą wykazywać zdolność degradacji proteoglikanów siarczanu. Dzięki temu możliwe są infiltracja i gromadzenie się w mikrośrodowisku nowotworowym komórek CAR-T, które uzyskują w ten sposób bezpośredni dostęp do komórek nowotworowych i mogą działać przeciwnowotworowo. Badania sugerują, że indukowanie ekspresji heparanazy w limfocytach T namnożonych *ex vivo* wraz z koekspresją specyficznego dla nowotworu chimerycznego receptora antygenowego poprawia ich zdolność do degradacji ECM bez pogarszania ich żywotności, ekspansji lub funkcji efektorowej i promuje zwiększoną aktywność przeciwnowotworową. Zastosowanie tej strategii może zwiększyć aktywność przeciwnowotworową komórek CAR-T u pacjentów z guzami litymi bogatymi w komórki zrębu [89].

Warto również zwrócić uwagę na bliski homolog heparanazy czyli heparanazę-2. Regiony kodujące te dwa enzymy wykazują całkowitą identyczność w 40%, natomiast podobieństwo sekwencji w 59% [79, 80]. Wydaje się, że heparanaza-2 ulega nadekspresji w nowotworach łagodnych i mniej agresywnych [73]. Homolog ten nie wykazuje aktywności enzymatycznej oraz hamuje aktywność heparanazy [90]. Dodatkowo heparanaza-2 reguluje geny promujące prawidłowe różnicowanie komórek, zwłóknienie guza, apoptozę, jak również zmniejsza ekspresję mediatorów proangiogenych [73, 80]. W nowotworach piersi heparanaza-2 wydaje się stanowić interesujący marker diagnostyczny. W porównaniu z tkanką nienowotworową wykazano jej obniżoną ekspresję w tkankach guza pacjentek z podtypem luminalnym A, podtypem luminalnym B oraz podtypem potrójnie ujemnym. Również ocena immunohistochemiczna wykazała istotne obniżenie ekspresji heparanazy-2 w tkankach inwazyjnych raków piersi typu przewodowego [73]. Ze względu na pełnioną rolę oraz główne cechy heparanaza-2 może stanowić istotny supresor nowotworów – Rycina 29.



Rycina 29. Działanie oraz główne cechy heparanazy-2 [73].

3.6.2. Działanie pronowotworowe heparanazy

Heparanaza zarówno poprzez aktywność enzymatyczną jak i nieenzymatyczną bierze udział w regulacji wszystkich cech charakterystycznych oraz umożliwiających powstanie i rozwój nowotworu – Tabela 12. Ponadto heparanaza odgrywa ważną rolę w angiogenezie nowotworowej i uczestniczy w niektórych nieenzymatycznych działaniach promujących rozwój nowotworów, niezależnie od jej udziału w degradacji i przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej [69, 74].

Tabela 12. Mechanizmy działania heparanazy w regulacji podstawowych cech nowotworu na podstawie Jayatilleke i wsp. [74].

Cecha nowotworu	Wpływ heparanazy
Podtrzymywanie sygnalizacji proliferacyjnej	Sygnalizacja onkogenna pośredniczy w ekspresji heparanazy, utrzymując mechanizmy dodatniego sprzężenia zwrotnego; Promowanie czynników wzrostu; Omijanie supresorów nowotworowych.
Brak wrażliwości na zewnętrzne czynniki hamujące wzrost	Promowanie sygnalizacji proliferacyjnej w celu przeciwdziałania mechanizmom hamowania wzrostu; Omijanie supresorów nowotworowych.
Zakłócenie mechanizmów apoptotycznych	Hamowanie apoptozy; Promowanie autofagii; Regulowanie martwicy.
Nieograniczony potencjał replikacyjny	Sygnalizacja za pośrednictwem HS; Promowanie interakcji między komórkami nowotworowymi a macierzą zewnątrzkomórkową.
Indukowanie angiogenezy	Zwiększenie biodostępności czynników proangiogennych; Promowanie inwazji komórek śródbłonna; Indukowanie ekspresji genu VEGF;

	Regulowanie odpowiedzi proangiogennych wywołanych hipoksją; Promowanie limfangiogenezy.
Aktywacja inwazji i przerzutów	Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej i błony podstawnej, ułatwiającej inwazję; Regulowanie mikrośrodowiska guza; Promowanie trombogenności i tworzenia klastrow CTCs; Modulacja macierzy zewnątrzkomórkowej i tworzenie niszy przed przerzutami.
Niestabilność i mutacja genomu	Regulowanie ekspresji MMP; Stymulowanie ekspresji genów.
Unikanie nadzoru immunologicznego	Regulacja sekrecji cytokin i chemokin immunosupresyjnych.
Indukowanie stanu zapalnego promującego nowotwór	Regulowanie migracji i aktywacji prozapalnych komórek układu immunologicznego; Ustanowienie ostrego i przewlekłego stanu zapalnego; Promowanie stanu zapalnego wywołanego progresją nowotworu.
Zmiana metabolizmu energetycznego	Regulowanie hipoksji mającej wpływ na metabolizm nowotworów; Wpływ na metabolizm glukozy.

VEGF – naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu, ang. vascular endothelial growth factor; MMP – metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej, ang. matrix metalloproteinase; CTCs – krążące komórki nowotworowe, ang. circulating tumor cells; HS – siarczan heparanu, ang. heparan sulphate.

3.7. Heparanaza w innych nowotworach

Ekspresja heparanazy jest podwyższona i związana z cechami kliniczno-patologicznymi również w nowotworach innych niż rak piersi [91]. W Tabeli 13 przedstawiono mechanizmy działania heparanazy w promowaniu rozwoju i progresji wybranych nowotworów innych niż rak piersi.

Tabela 13. Mechanizmy działania heparanazy w wybranych nowotworach [92-96].

Rodzaj nowotworu	Mechanizm działania heparanazy	Piśmiennictwo
Glejak	Zwiększa migrację i inwazję komórek nowotworowych. Zwiększa odporność komórek nowotworowych na stres oksydacyjny oraz chemioterapię.	[92]
Szpiczak mnogi	Promuje wzrost, proliferację, migrację i powstawanie przerzutów komórek nowotworowych. Reguluje transkrypcję genów, promuje osteolizę, angiogenezę, tworzenie egzosomów, uwalnianie syndekanu-1 oraz lekooporność. Wzmaga ekspresję markerów mezenchymalnych takich jak wimentyna, fibronektyna i RANK. Zwiększa ruchliwość komórek szpiczaka mnogiego.	[93, 94]
Gruczolak jelita grubego	Reguluje zarówno poziom, jak i lokalizację syndekanu-1 w mikrośrodowisku guza.	[95]
Rak płuc	Promowanie angiogenezy poprzez synergistyczne działanie z VEGF-C.	[96]

RANK – aktywator receptora czynnika jądrowego κ B, ang. receptor activator of nuclear factor κ B; VEGF-C – naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu C, ang. vascular endothelial growth factor C.

Dodatkowo zależność pomiędzy wzrostem ekspresji heparanazy a krótszym czasem przeżycia bez nawrotu choroby została wykazana w przypadku nowotworów w obrębie głowy i szyi [86], raka żołądka [91], raka płuc [96] oraz glejaka [97].

3.8. Heparanaza w raku piersi

Na podstawie immunohistochemicznej oceny ekspresji heparanazy w tkankach nowotworu piersi wykazano wyższą ekspresję heparanazy w porównaniu zarówno z prawidłowymi tkankami piersi jak i tkankami sąsiadującymi [91]. Ekspresja heparanazy również koreluje z wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi raka piersi. Stwierdzono, że bardziej agresywne linie komórkowe charakteryzują się wysokim poziomem heparanazy

w odróżnieniu od mniej inwazyjnych linii komórkowych raka piersi, które nie prowadziły do rozwoju przerzutów [98]. Wyższa ekspresja heparanazy była związana z niekorzystnym stopniem złośliwości histologicznej, zwiększoną tendencją do tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych, większymi rozmiarami guza, bardziej agresywnymi cechami biologicznymi jak również pozytywnym statusem HER2 [91].

Dodatkowo w nowotworze piersi wysoka ekspresja heparanazy stanowi niezależny czynnik ryzyka i wiąże się z gorszym rokowaniem. Stwierdzono niższe wartości następujących wskaźników: całkowitego przeżycia, przeżycia bez nawrotu choroby, przeżycia wolnego od przerzutów odległych oraz przeżycia po progresji choroby [99]. Na podstawie analizy 5-letniego przeżycia również wykazano negatywny związek pomiędzy wysoką ekspresją heparanazy a czasem przeżycia [91]. Zależność pomiędzy ryzykiem nawrotu choroby a poziomem heparanazy została zauważona w I stopniu zaawansowania klinicznego raka piersi, czyli wśród pacjentek z guzami o średnicy mniejszej niż 2 cm i bez zajęcia węzłów chłonnych. Wysoki poziom heparanazy korelował z 4,5-krotnie wyższym ryzykiem nawrotu choroby [100]. Dodatkowo u pacjentów ze zwiększoną ekspresją heparanazy ryzyko nawrotu choroby po chemioterapii było znacznie wyższe niż u pacjentów z niską ekspresją heparanazy, niezależnie od podtypu molekularnego guza. Może to świadczyć o roli heparanazy w promowaniu oporności na chemioterapię [87].

W wielu typach nowotworów, również w raku piersi angiogeneza jest kluczowym etapem progresji choroby [98]. Heparanaza sprzyja rozwojowi raka piersi m.in. poprzez udział w tworzeniu naczyń włosowatych i zwiększaniu gęstości naczyń mikrolimfatycznych. Możliwe mechanizmy leżące u podstaw tych efektów obejmują: degradację HS oraz zniesienie w ten sposób bariery macierzy zewnątrzkomórkowej, uwalnianie cytokin, które są wiązane przez HS oraz promowanie w ten sposób inwazji komórek nowotworowych i powstawanie przerzutów, tworzenie mikrośrodowiska zawierającego aktywne biologicznie fragmenty HS sprzyjające przeżyciu komórek nowotworowych [91].

Wydaje się, że heparanaza bierze także udział w regulacji potencjału przerzutowego raka piersi. Wykazano, że komórki raka piersi z przerzutów do mózgu w porównaniu z niezmiennymi nowotworowo komórkami wykazywały wyższy poziom heparanazy [98].

II. CEL

Nowotwór piersi jest jedną z najczęstszych globalnych przyczyn zachorowalności i umieralności wśród kobiet. Według danych z 2020 roku na każde 100 000 osób standardowej populacji świata przypada rocznie 46,3 zachorowań na nowotwór piersi. Stale zmieniające się mikrośrodowisko nowotworu odgrywa kluczową rolę w progresji, inwazji i tworzeniu przerzutów nowotworu piersi. Wzrost uwalniania VEGF związanego z HSPG macierzy zewnątrzkomórkowej może prowadzić do wzrostu mobilizacji EPCs jak również do zwiększonej ekspresji TF. Powyższe interakcje napędzane także przez wzrost stężenia heparanazy dodatkowo nasilają jego prozapalny, prozakrzepowy i proangiogeny charakter. Wykazano również wpływ stanu zapalnego o charakterze ogólnoustrojowym na rozwój i progresję nowotworów złośliwych. Interesujący wydaje się fakt, że znaczna poprawa w diagnostyce i leczeniu pierwotnego raka piersi, którą obserwujemy w ostatnich latach nie poprawiła całkowitego przeżycia pacjentek. Być może wynika to z faktu, że rak piersi jest chorobą heterogenną pod względem klinicznym, histopatologicznym, molekularnym i genetycznym. Zatem złożona heterogeniczność raka piersi na poziomie molekularnym wymusza poszukiwanie biomarkerów prognostycznych, które można w prosty sposób oznaczyć i wprowadzić do codziennej praktyki klinicznej.

Celem pracy była ocena stężeń heparanazy, wybranych markerów angiogenezy (VEGF-A, sVEGFR-1, sVEGFR-2), liczby krążących komórek progenitorowych śródbłonna o immunofenotypie CD45-/CD34+/CD31+/CD133+, hormonów wydzielanych przez tkankę tłuszczową (adiponektyna, leptyna), markera stanu zapalnego – białka YKL-40 oraz ocena aktywności czynnika tkankowego (TF) w grupie pacjentek z pierwotnym, jednostronnym nowotworem piersi bez przerzutów odległych. Ponadto określono zależności pomiędzy tymi parametrami a wybranymi wskaźnikami antropometrycznymi oraz kliniczno-patologicznymi takimi jak: klasyfikacja kliniczna TNM, ocena stopnia złośliwości histologicznej, podtyp molekularny nowotworu piersi, średnica guza i ekspresja markera proliferacji Ki67. Oceniono także wpływ zastosowanego leczenia chirurgicznego oraz standardowych terapii uzupełniających na zmianę stężenia heparanazy. Dodatkowym celem badania była próba określenia wartości prognostycznej analizowanych parametrów w przewidywaniu nawrotu choroby nowotworowej.

III. MONOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI

Podstawą do wnioskowania o uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych jest osiągnięcie naukowe w postaci cyklu artykułów naukowych opublikowanych pod tytułem:

„Ocena przydatności oznaczenia heparanazy, wybranych markerów angiogenezy, hemostazy oraz hormonów wydzielanych przez tkankę tłuszczową jako czynników prognostycznych w grupie pacjentek z rozpoznanym pierwotnym nowotworem piersi.”

Osiągnięcie stanowią 3 oryginalne prace opublikowane w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Sumaryczny współczynnik oddziaływania, impact factor (IF) wynosi **11,849** punktacja **MNiSW – 350 pkt.**

1. **Bielawski K**, Rhone P, Bielawska S, Rosc D, Brkic A, Zarychta E, Ruszkowska-Ciastek B. Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate. J Physiol Pharmacol. 2019; 70(3): 455-466. **IF: 2,644**; punktacja **MNiSW: 70 pkt.**, (praca oryginalna)

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: przeglądzie piśmiennictwa, analizie statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników, podsumowaniu i sformułowaniu ostatecznych wniosków badawczych, redakcji manuskryptu oraz prezentacji uzyskanych wyników na konferencjach tematycznych.

Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 65%.

2. **Bielawski K**, Rhone P, Bulsa M, Ruszkowska-Ciastek B. Pre-Operative Combination of Normal BMI with Elevated YKL-40 and Leptin but Lower Adiponectin Level Is Linked to a Higher Risk of Breast Cancer Relapse: A Report of Four-Year Follow-Up Study. J Clin Med. 2020;9(6):1742. **IF: 4,241**; punktacja **MNiSW: 140 pkt**, (praca oryginalna)

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: przeglądzie piśmiennictwa, analizie statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników, podsumowaniu i sformułowaniu ostatecznych wniosków badawczych oraz redakcji manuskryptu.

Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 75%.

3. Ruszkowska-Ciastek B*, **Bielawski K***, Zarychta E, Rhone P. Impact of adjuvant treatment on heparanase concentration in invasive, unilateral breast cancer patients: results of a prospective single-centre cohort study. J Clin Med. 2021; 10(10): 2184. **IF: 4,964**; punktacja **MNiSW: 140 pkt**, (praca oryginalna); (* Ruszkowska-Ciastek B i Bielawski K wnieśli równy wkład w powstanie publikacji).

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: przeglądzie piśmiennictwa, analizie statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników, podsumowaniu i sformułowaniu ostatecznych wniosków badawczych oraz redakcji manuskryptu.

Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 45%.

Zgoda komisji bioetycznej

Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (sygnatura: KB/547/2015). Wszyscy pacjenci wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w tym badaniu.

Wprowadzenie do badania opublikowanego w pracy nr 1:

Bielawski K, Rhone P, Bielawska S, Rosc D, Brkic A, Zarychta E, Ruszkowska-Ciastek B. Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate. *J Physiol Pharmacol.* 2019; 70(3): 455-466. **IF: 2,644**; punktacja

MNiSW: 70 pkt.

Na podstawie danych Światowej Organizacji Zdrowia szacuje się, że w 2018 roku globalna zachorowalność na nowotwory wzrosła do 18,1 mln nowych przypadków. Najczęściej diagnozowany nowotwór kobiecej w zdecydowanej większości krajów stanowi nowotwór piersi, który ze względu na częste rozpoznawanie w niekorzystnych stadiach jest również jedną z głównych przyczyn zgonów związanych z chorobami nowotworowymi.

Klasyfikacja molekularna nowotworów piersi jest jedną z najczęściej stosowanych klasyfikacji. Opiera się ona na immunohistochemicznym oznaczaniu receptorów estrogenowych, receptorów progesteronowych, receptora 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu, Ki67 oraz ekspresji E-kadheryny. Według bazy danych Surveillance, Epidemiology and End Results kobiety z guzami ER i PR-dodatnimi miały statystycznie dłuższe wskaźniki przeżycia niż kobiety z guzami z ujemnymi receptorami hormonalnym (ER- oraz PR-). Efekt ten jest widoczny we wszystkich grupach wiekowych i jest niezależny od stadium choroby, stopnia zaawansowania guza, podtypu histologicznego guza czy pochodzenia etnicznego.

W ostatnich latach badania koncentrują się na genetycznych i biochemicznych składnikach zaangażowanych w progresję nowotworu i jego mikrośrodowisko. Stwierdzono, że w rozwój i progresję choroby nowotworowej silnie zaangażowane jest macierz zewnątrzkomórkową, która stanowi nie tylko szkielet dla tkanek i narządów ale jest również ważnym rezerwuarem cytokin, chemokin oraz licznych czynników wzrostu. Jednym ze składników macierzy zewnątrzkomórkowej są proteoglikany siarczanu heparanu (HPSG), które odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu integralności strukturalnej oraz wiążą czynniki wzrostu takie jak: podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), czynnik wzrostu śródbłona naczyniowego (VEGF), czynnik wzrostu keratynocytów i czynnik wzrostu hepatocytów (HGF). Stąd jego funkcja wspomagająca w angiogeneza i dalsze rozprzestrzenianie się nowotworu.

Jedynym enzymem w organizmach eukariotycznych zdolnym do enzymatycznego rozszczepienia i degradacji HSPG jest heparanaza. Aktywność enzymatyczna heparanazy prowadzi do dezintegracji macierzy zewnątrzkomórkowej oraz dyfuzji cytokin i czynników wzrostu, które wzmacniają angiogenezę, aktywują układ immunologiczny, przyspieszają autofagię oraz modulują skład egzosomów. Dodatkowo heparanaza stanowi kofaktor czynnika tkankowego, a jej aktywność nieenzymatyczna skutkuje wzmocnieniem aktywności układu krzepnięcia oraz aktywuje kaskadę sygnalizacyjną, która wzmaga fosforylację wybranych białek takich jak Akt, ERK, p38 i Src. Aktywność ta również sprzyja rozwojowi nowotworu oraz powstawaniu przerzutów. Badania wskazują, że enzym ten jest silnie zaangażowany w rozwój stanu zapalnego oraz choroby nowotworowej, a wzrost stężenia heparanazy koreluje ze zwiększoną gęstością naczyń i krótszym czasem przeżycia wolnym od nawrotu choroby nowotworowej.

W publikacji numer 1 badaniem objęto 86 kobiet w wieku od 40 do 71 lat (mediana 55 lat) z pierwotnym jednostronnym nowotworem piersi w stopniu zaawansowania IA-IIB (bez przerzutów odległych). Pacjentki były kwalifikowane do badania od listopada 2015 r. do stycznia 2018 r. i znajdowały się pod opieką personelu z Oddziału Klinicznego Nowotworów Piersi i Chirurgii Rekonstrukcyjnej Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy. Wszystkie zakwalifikowane pacjentki zostały objęte obserwacją od daty pierwszej wizyty do najwcześniejszego zdarzenia, tj. wystąpienia przerzutów choroby nowotworowej, zgonu lub ostatniego kontaktu na koniec marca 2019 r. W analizie przeżycia bez nawrotów wystąpiło dziesięć zdarzeń, a okres obserwacji wynosił od 19 do 41 miesięcy (mediana czasu obserwacji wyniosła 33,5 miesiąca) z 11,6% odsetkiem nawrotów.

Głównymi kryteriami włączenia były: pierwotny, inwazyjny, jednostronny rak piersi we wczesnym stadium oraz dobry ogólny stan zdrowia. Natomiast do głównych kryteriów wykluczenia należała płeć męska, rak in situ, guzy T3-T4, stopień zaawansowania wyższy niż IIB, leczenie neoadjuwantowe. Dodatkowo wykluczone z badania zostały pacjentki, u których stwierdzono: obecność niekontrolowanej choroby sercowo-naczyniowej, choroby płuc, choroby wątroby, niewydolność tarczycy, jawną cukrzycę, dyslipidemię, choroby naczyń mózgowych, wcześniej istniejącą przewlekłą chorobę autoimmunologiczną lub zapalną, niedawno przebyte krwawienia lub zdarzenia zakrzepowe.

W grupie badanej najczęściej występującym typem molekularnym nowotworu piersi był typ luminalny A (58% pacjentek). Ponadto w grupie badanej zaobserwowano następujące

występowanie wybranych cech kliniczno-patologicznych: wielkość guza < 2cm u 70% pacjentek, brak zajęcia węzłów chłonnych u 77% pacjentek oraz typ przewodowy u 88% pacjentek.

W ramach badania oceniano stężenie heparanazy, naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF-A) oraz rozpuszczalnych form receptora 1 i receptora 2 dla VEGF (odpowiednio sVEGFR-1 i sVEGFR-2). Stężenia tych parametrów zostały oznaczone z zastosowaniem testów immunoenzymatycznych. Dodatkowo przy użyciu cytometrii przepływowej określono liczbę krążących komórek progenitorowych śródbłonka o immunofenotypie CD45-/CD34+/CD31+/CD133+.

Celem pracy była analiza stężeń wybranych parametrów angiogennych oraz liczby krążących komórek progenitorowych śródbłonka w podgrupach utworzonych ze względu na występowanie niskich, średnich i wysokich stężeń heparanazy. Na podstawie powyższego podziału wykonano również analizę z zastosowaniem krzywej przeżycia Kaplana-Meiera w celu określenia grupy pacjentek z nowotworem piersi najbardziej narażonych na nawrót choroby nowotworowej.

Stworzono także pojedyncze krzywe ROC dla heparanazy, krążących EPCs, VEGF-A, sVEGFR-1, sVEGFR-2 oraz krzywą ROC i regresję Cox'a dla modelu składającego się z tych parametrów w celu oceny ich zdolności diagnostycznej do przewidywania nawrotu choroby nowotworowej. Dodatkowo przeprowadzono analizę stężenia heparanazy w zależności od występowania wybranych cech demograficznych, antropometrycznych, molekularnych oraz kliniczno-patologicznych.

W wyniku przeprowadzonych analiz statystycznych **w pierwszej publikacji** odnotowano istotnie wyższe stężenie heparanazy wśród pacjentek z ujemnym statusem receptora estrogenowego oraz progesteronowego w porównaniu do pacjentek z dodatnim statusem receptora estrogenowego oraz progesteronowego. Ponadto, zaobserwowano istotnie wyższe stężenie heparanazy w podgrupie pacjentek z guzami o średnicy od 2 do 5 cm (T2) w porównaniu do podgrupy pacjentek z guzami o średnicy poniżej 2 cm (T1).

W zależności od niskiego, średniego i wysokiego stężenia heparanazy odnotowano wzrost stężenia krążących EPCs oraz wzrost stężenia rozpuszczalnej formy VEGFR-2 wraz ze wzrostem stężenia heparanazy. W przypadku stężenia sVEGFR-1 w grupach z niskim i średnim stężeniem heparanazy wykazano jego wzrost. Jednak w grupie z wysokim stężeniem heparanazy stwierdzono najniższe stężenie sVEGFR-1. Dodatkowo wraz ze wzrostem stężenia

heparanazy odnotowano spadek potencjału antyangiogennego wyrażonego przez stosunek sVEGFR-1/VEGF-A oraz wykazano wzrost wartości stosunku sVEGFR-2/sVEGFR-1, co wskazuje na wzrost zaangażowania w bardziej zaawansowanych procesach sVEGFR-2 w porównaniu do sVEGFR-1.

Analiza krzywych ROC wyznaczonych dla pojedynczych parametrów wykazała, że stężenia heparanazy oraz rozpuszczalnej formy VEGFR-1 mogą być przydatne do oszacowania wystąpienia nawrotu choroby nowotworowej. Przy użyciu indeksu Youdena określono najlepsze punkty odcięcia w celu odróżnienia pacjentów z nawrotem choroby od pacjentów bez nawrotu choroby. Wynoszą one odpowiednio 213,74 pg/ml dla heparanazy (czułość 70%, swoistość 80%, $AUC^{ROC} = 0,72$) oraz 37,81 pg/ml dla sVEGFR-1 (czułość 43%, swoistość 100%, $AUC^{ROC} = 0,68$). Natomiast analiza krzywej ROC stworzonej dla modelu uwzględniającego stężenia heparanazy, krążących EPCs, VEGF-A, sVEGFR-1 oraz sVEGFR-2 wskazuje na silny potencjał diagnostyczny tego modelu do przewidywania nawrotu choroby nowotworowej ze względu na $AUC = 0,8132$ i $p = 0,0064$.

Analiza regresji Cox'a, która uwzględnia czas obserwacji oraz czas wystąpienia nawrotu choroby wykazała, że w analizowanym modelu najistotniejszymi predyktorami nawrotu choroby nowotworowej są stężenia VEGF-A oraz sVEGFR-2.

Na podstawie krzywych przeżycia Kaplana-Meiera odnotowano znacznie większą częstość nawrotów choroby u pacjentek z wysokim stężeniem heparanazy (>200 pg/ml) w porównaniu do podgrup z niskimi (<140 pg/ml) i średnimi (140-200 pg/ml) stężeniami heparanazy. W grupie z wysokim stężeniem heparanazy spośród 34 pacjentek u 8 (23,5%) stwierdzono nawrót choroby nowotworowej. Natomiast wśród 25 pacjentek z niskim stężeniem heparanazy nawrót choroby odnotowano u 1 pacjentki (4%).

Z badania wynika, że wysokie stężenie heparanazy może być predyktorem krótszego przeżycia bez progresji choroby. Ponadto wzajemne interakcje pomiędzy heparaną a waskulogenezą i angiogenezą mogą mieć kluczowe znaczenie w rozwoju przerzutów. Również wielkość guza oraz brak ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych mogą mieć związek z wyższym stężeniem heparanazy oraz mogą służyć jako wskaźniki bardziej agresywnego charakteru komórek nowotworowych i krótszego czasu przeżycia.

K. BIELAWSKI¹, P. RHONE², S. BIELAWSKA¹, D. ROSC¹, A. BRKIC¹, E. ZARYCHTA¹, B. RUSZKOWSKA-CIASTEK¹

HEPARANASE LINK BETWEEN VASCULOGENESIS AND ANGIOGENESIS AS WELL AS A PREDICTIVE FACTOR OF A SHORTER SURVIVAL RATE

¹Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Bydgoszcz, Poland; ²Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre Prof. F. Lukaszczuk Memorial Hospital, Bydgoszcz, Poland

Heparanase concentration is low in normal epithelia cells but its overexpression is reported in many carcinomas, including sarcomas and haematological malignancies. The purpose of this study was to investigate the association with selected angiogenic parameters as well as in the number of circulating endothelial progenitors (EPCs) in respect to low, moderate and high concentrations of heparanase. Also, we estimated the diagnostic usefulness of the heparanase concentration for disease recurrence prediction in breast cancer cases. Eighty-six patients with IA-IBB stage invasive breast carcinoma who passed a comprehensive clinicopathologic evaluation were included in the study. The median tumour diameter was 1.5 cm. Twenty cases showed lymph node metastasis (N1). Follow-up was completed in all patients a median follow-up was 33.5 months with a 11.6% recurrence rate. An immunoassay of selected angiogenic parameters, heparanase, as well as an immunohistochemistry of oestrogen and progesterone receptors, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), Ki67 and E-cadherin was performed in all cases. Circulating EPCs were determined by flow cytometry. Higher levels of heparanase in oestrogen and progesterone receptor negative cancers than in positive ones were noted. A higher concentration of heparanase was observed in T2 cases than T1 subjects. Significant positive associations between circulating EPCs, soluble forms of VEGF receptors and increasing plasma levels of heparanase were obtained. Follow-up revealed a significantly higher incidence of disease relapse in breast cancer patients with high baseline concentrations of heparanase. Heparanase was the most accurate biomarker with an $AUC^{ROC} = 0.72$. The cut-off value of 213.74 $\mu\text{g/mL}$ was identified in order to discriminate between disease recurrence patients and those without disease relapse. We suggest, that a high concentration of heparanase next to tumour size and oestrogen and progesterone receptor expression may serve as an indicator of a more an aggressive character of tumour cells and a shorter survival rate.

Key words: *heparanase, invasive breast cancer, angiogenesis, vasculogenesis, tumour progression, circulating endothelial progenitors, growth factor receptors*

INTRODUCTION

According to the World Health Organization, global cancer morbidity is estimated to have risen to 18.1 million new cases and 9.6 million deaths in 2018. Breast cancer (BC) is the most frequently diagnosed female cancer in the vast majority of the countries and, additionally, is also the leading cause of cancer death due to still its recognition in unfavourable stages. In 2018, almost 2.1 million newly diagnosed breast cancer cases were identified worldwide (1). This accounts for 24.2% of cancer patients among women (1, 2).

In recent years, studies have focused on the genetic and biochemical components involved in tumour progression and its microenvironment. This has enabled understanding of the biology of breast tumour cells, improved treatment patterns and an increase in the survival rates of patients with breast cancer (3). Several breast cancer classifications are used. However, the most common classification, in order to determine survival rates, is the molecular one, which is based on the immunohistochemical

(IHC) estimation of oestrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and Ki67, E-cadherin expression (4, 5). Premenopausal patients are more likely to develop ER-negative cancers than postmenopausal cases. According to the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) database, women with ER and PR positive tumours had statistically longer survival rates than those with negative hormonal receptor (ER-PR-) tumours. This effect is visible in all age groups and it is independent of disease stage, tumour grade, tumour histological subtype or ethnicity (5). The one of a main indicator of potential responses to hormonal therapy is ER expression and the best established a selective ER modulator (SERM) is tamoxifen. Thus, interesting seem resveratrol' anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-carcinogenic properties. This is natural polyphenol present both estrogenic and antiestrogenic features when bound to the ER and therefore has potential SERMs-like (6).

The tumour microenvironment, encircled by the extracellular matrix (ECM), is a mosaic of crucial various cell types that are

responsible for the complex pathways of tumourigenesis, including cell proliferation, motility, apoptosis, and formation new blood vessels. Also, in BC progression, invasion and metastasis, the ECM plays a crucial role (2, 7). The two main classes of ECM macromolecules consist of fibrous proteins and polysaccharide chains belonging to the glycosaminoglycan class (GAG). The fibrous proteins include proteins with a mainly structural function (collagen and elastin) and proteins with a principally adhesive ability (laminins, nidogens, fibronectin and vitronectin) (8). When GAGs bind to proteins, they form proteoglycans, which can be rich in sulphate groups (3). Heparan sulphate proteoglycans (HSPGs) can be anchored to the cell surface and are important proteoglycans present in the ECM (3, 8-10). HSPGs inhibit cancer cell invasion by promoting the interaction between cells or between cells and the ECM. Additionally, HSPGs have a role in maintaining the structural integrity and self-assembly of the ECM (8, 10, 11). Heparan sulphate demonstrates an important role in building the cellular microenvironment and in cell signalling in the basement membrane and ECM through, among others, binding to growth factors: basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), keratinocyte growth factor, and hepatocyte growth factor (HGF), hence, its supporting function in angiogenesis and the distal spreading of the cancer (12).

In eukaryotic organisms there is only one enzyme that is able to enzymatically cleave and degrade the heparin sulphate side chains from HSPGs; this reaction is strongly involved in tumour growth, metastasis, and inflammation (7, 13, 14). This enzyme is named heparanase. It is an endo-B-D-glucuronidase and presents two activities: enzymatic and non-enzymatic, with both functions having an influence on a decrease in the structural integrity of the basement membrane and ECM. The enzymatic activity of the heparanase (58 kDa) dimer consists of 50 kDa and 8 kDa subunits non-covalently linked causing the remodelling of the ECM. Thus, it leads to diffusion of cytokines, growth factors and lipoproteins which can enhance angiogenesis, activation of the immune system, coagulation, acceleration of autophagy and exosome composition (3, 8, 10). Interestingly, an ideal enzymatic action of heparanase is observed in acidic milieu (pH = 5.8 - 6.2), which occurs in tumour microenvironment (14). Additionally, the pro-enzyme heparanase (65 kDa) has non-enzymatic properties and is able to induce the signalling cascade that enhances phosphorylation of selected proteins such as Akt, ERK, p38 and Src. Those activities promote tumour invasion and metastasis (3, 8, 11, 14). Furthermore, non-enzymatic function of heparanase is associated with hypercoagulability state. There is some evidence that heparanase is a cofactor of tissue factor. This function works as a vicious cycle, since tissue factor leads to thrombosis in tumour by elevation of thrombin and fibrin deposition and finally platelets activation. It is well-established that expression of heparanase is limited principally to the platelets, thus in this manner a more heparanase is realized from platelets (8, 14). Moreover, heparanase non-enzymatic property enhances a pro-inflammatory cell adhesion and signal transduction (8).

Additionally, studies indicate that up-regulation of heparanase correlates with enhanced vascular density, and shorter postoperative survival of cancer patients (15, 16). There is no data presenting the impact of heparanase on the number of endothelial progenitors (EPCs) which are involved in vasculogenesis. Mutual interactions between both components could be an insight into the early steps of tumour development, since circulating bone marrow-derived EPCs contribute to tumour neovascularisation (17). The EPCs characterized high proliferative potential and are mobilised during breast cancer development due (4). The aim of the study was to analyse fluctuations in selected angiogenic parameters as well as in the number of circulating endothelial progenitors in respect to low,

moderate and high concentrations of heparanase. Additionally, we assessed the diagnostic accuracy of heparanase concentration for disease relapse prediction in breast cancer subjects.

MATERIALS AND METHODS

Patient samples and clinical data

The present study was approved by the Bioethics Committee Collegium Medicum in Bydgoszcz, the Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland (reference number: KB/547/2015) and the study was conducted in accordance with the principles embodied in the Declaration of Helsinki. All patients provided written informed consent to participate in this study after a full explanation of the study had been given.

The current study comprised of 86 cases aged 40 to 71 (mean age of 55 years) with newly diagnosed breast malignancy with stage IA-IIB post partial or radical mastectomy, who underwent a comprehensive histopathological confirmation of the diagnosis. All patients also provided a full history and underwent general clinical examinations. Eligible women were recruited between November 2015 and January 2018 by the oncologist from the Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre Professor F. Lukaszczyk Memorial Hospital, Bydgoszcz, Poland.

The medical records of all the invasive breast cancer (IBrC) patients were reviewed to obtain anthropometric, demographic data, which included age (dichotomised according to a median age of 55 years), menopausal status, parity (defined as full-term pregnancies), smoking history (non-smokers or ever-smoked), weight, height, alcohol intake history, past medical history including any previous history of thromboembolic events, other disorders and any drug intake. In this group, 30 patients (34%) were recognised as overweight and 15 (17%) as obese. The median value for the patients' body mass index (BMI) was 25.08 kg/m². Twenty-eight patients (33%) were premenopausal and 58 (67%) were postmenopausal. Baseline patient characteristics are presented in *Table 1*. Full details about the study's recruitment and procedures have been reported in a previous paper (18).

Tumour localisation and size, lymph node status, histological type, histological grade, and molecular subtypes have been obtained from all study participants. TNM (T - tumour, N - node, M - metastasis) classification was performed by a histopathological specimen in all cases. The breast cancer patients were free of distant metastasis (M0). The median tumour diameter was 1.5 cm (range 0.5 - 3.5 cm). Twenty cases (23%) showed lymph node metastasis (N1). The clinical staging was performed according to the AJCC 7th Edition Staging for Breast Cancer. There were 41 (48%) patients with stage IA (T1N0M0 - T1 tumours without nodal micrometastases) and 39 (45%) cases with stage IIA (T1N1M0 - T1 tumours with nodal micrometastases or T2N0M0 - T2 without nodal micrometastases), while six cases (7%) had stage IIB, which was defined by T2N1M0 - T2 with nodal micrometastases. Histological grading according to Elston-Ellis classification was available for all patients, consisting of five cases in grade 1, 65 subjects developed grade 2 and 16 patients had grade 3. The most common histological IBrC type was invasive ductal carcinoma, accounting for 88% (n = 76), followed by invasive lobular carcinoma (n = 10; 12%). Patients were stratified by molecular subtype according to an immunohistochemical marker profile including oestrogen and progesterone receptors (ER, PR, respectively), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), Ki67, and E-cadherin expressions. The positive expression rates for ER, PR and HER2 were established in 87%, 80% and 12% of cases, respectively. The clinical and

Table 1. The heparanase concentration according to demographic and anthropometrical determinants in study population.

Feature	Number of patients (%)	Heparanase concentration (pg/mL)	P-values
	86 (100%)	176.98 137.80/268.29	
Age			
< 55 years	45 (52%)	174.74 135.68/270.91	0.8471
≥ 55 years	41 (48%)	179.21 137.80/245.32	
Menopausal status			
Premenopausal	28 (33%)	165.88 124.13/241.82	0.3567
Postmenopausal	58 (67%)	185.97 137.80/268.29	
Body mass index			
≤ 24.9 kg/m ²	41 (48%)	170.30 135.68/252.87	0.5597
25 – 29.9 kg/m ²	30 (35%)	209.05 137.80/286.91	
30 – 39.9 kg/m ²	15 (17%)	157.13 137.80/257.96	

pathological characteristics of the patients are summarised in Tables 2 and 3.

Inclusion and exclusion criteria for study participants

The major inclusion criteria were primary, invasive, unilateral, early-stage breast cancer and good general health and wellbeing. Exclusion criteria were male gender, carcinoma in situ, T3-T4 tumours, stage after IIB, neoadjuvant treatment and locally advanced or metastatic cancer. Additional exclusions were as follows: the presence of uncontrolled cardio-vascular disease, lung diseases, liver diseases, thyroid impairment, overt diabetes mellitus, dyslipidaemia, cerebral-vascular diseases, pre-existing chronic autoimmune or inflammatory disease, recent bleeding or thrombotic events.

Patient follow-up information

Follow-up was completed in 86 patients. For the relapse free survival analysis ten events occurred and follow-up ranged from 19 to 41 months (median follow-up was 33.5 months) with a 11.6 % recurrence rate. Follow-up times were calculated from the date of the initial visit until the earliest event of interest, *i.e.* disease spread, death or the last date of contact as of the end of March 2019, and were expressed in months.

Immunohistochemistry analysis

Formalin-fixed and paraffin-embedded tumour sections were used for the immunohistochemistry detection of oestrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) and Ki67 expression. The ER and PR status were defined in accordance with the recommendations of the ASCO/CAP using SP1 and 1E2 primary

antibodies (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA), respectively. Receptor status is assessed as positive if there are at least 1% of tumour cells observed with nuclear staining and negative if the nuclear staining is completely absent. For the semi-quantitative detection of HER2, the rabbit monoclonal primary antibody VENTANA anti-HER2/neu (4B5) was used with a VENTANA aperture for staining the IHC microscopic slide (Benchmark Ultra, Roche-Ventana). HER2 scores were assessed using the standard ASCO/CAP guideline reporting system on a scale of 0, 1+, 2+ and 3+. Tumours with 0 or 1+ scores were considered as HER2-negative and those with 3+ scores were considered as HER2-positive. Tumours with 2+ scores were regarded as equivocal and tested by fluorescence in situ hybridisation (FISH). The Ki-67 antigen was scored as a percentage of nuclei-stained cells of all the cancer cells by using a monoclonal mouse antibody (Auto-stainer Link 48, Agilent Technologies, USA). The cut-off value for the Ki-67 proliferation index was 14% in all statistical analysis.

Blood collection and laboratory measurements *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Venous blood (4.5 ml) for testing for heparanase, vascular endothelial growth factor (VEGF-A), and its soluble forms of receptor types 1 and 2 and for the determination of the number endothelial progenitors (EPCs) was collected under standard operating procedures and conditions into tubes (Becton Dickinson Vacutainer® System, Plymouth, UK) containing potassium ethylenediaminetetraacetic acid (K₂EDTA). Whole blood samples were processed within 2 h after collection in order to estimate the accurate number of circulating EPCs. The remaining blood samples were immediately mixed and centrifuged at 3000 × g at +4°C for 15 min and then frozen at -80°C (as specified by the manufacturer) until assayed within six months.

Table 2. The heparanase concentration according to molecular characteristics in breast cancer cases.

Feature	Number of patients (%)	Heparanase concentration (pg/mL)	P-values
Expression of Ki 67			
< 15%	45 (52%)	165.88 135.68/213.74	<u>0.0961</u>
≥ 15%	41 (48%)	192.80 142.05/284.21	
Expression of HER2			
Negative	76 (88%)	183.71 137.80/266.99	0.6762
Positive	10 (12%)	159.31 137.80/378.48	
Hormone receptor status			
ER+	75 (87%)	165.88 135.68/257.96	0.0196
ER-	11 (13%)	268.29 213.74/378.49	
PgR+	69 (80%)	165.88 135.68/240.35	0.0163
PgR-	17 (20%)	265.69 197.40/378.49	
E-cadherin status			
Positive	81 (94%)	183.71 137.80/268.29	0.3145
Negative	5 (6%)	152.79 133.57/179.21	

ER, oestrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; Ki67, proliferation marker; PR, progesterone receptor; significant differences are denoted by bold P-values; an underlined P-value represents closeness to statistical significance.

ELISA kits were used to quantify the EDTA-plasma concentrations of VEGF-A, the soluble form of VEGF receptors type 1 and 2 (VEGF-A; sVEGFR1/Flt-1; sVEGFR2/KDR Immunoassay Test, Quantikine, R&D systems, USA - respectively), and heparanase (ELISA Kit for Heparanase; HPA; Cloud-Colne Corp., TX, USA). The reaction mixture was added to a 96-well plate (18).

Flow cytometry

Determination of circulating endothelial progenitor cells with the immunophenotype CD34+CD133+CD31+CD45- were made by flow cytometry according to the methodological procedures, which had previously been published (18). All assays were run according to the manufacturer's specifications by personnel with no access to the clinical data of the patients.

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using Statistica v. 13.1 (StatSoft®, Cracow, Poland). The normality of the data set was tested by the Shapiro-Wilk test. Data are presented as percentages or medians and interquartile ranges (IQR) for non-normally distributed variables. Statistical differences between

subgroups were determined with the U Mann-Whitney test or the ANOVA Kruskal-Wallis test. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to assess the diagnostic predictive capacity of the selected analysed biomarkers. The area under the curve (AUC) was calculated in order to estimate the diagnostic accuracy. The optimal cut-off points were determined according to Youden criteria. The multivariate Cox's regression analysis was used to determine the predictors for progression-free survival. The progression-free survival (PFS) time was calculated from the date of enrolment until the relapse or progression of the disease. PFS curves were calculated by the Kaplan-Meier method and the significance levels were assessed according to the log-rank test. P values less than 0.05 were considered statistically significant in all analyses.

RESULTS

Clinical summarisation of the study population

The mean patient age was 55 years. There were patients who underwent breast conserving surgery in 69 cases (80%) and who underwent mastectomy in 17 (20%). In the histological differentiation of IBc, patients had differentiated invasive

Table 3. The heparanase concentration in respect to clinical and pathological characteristics in breast cancer subjects.

Feature	Number of patients (%)	Heparanase concentration (pg/ml)	P-values
Tumour localisation			
Left breast	44 (52%)	190.52 138.86/281.53	0.3464
Right breast	42 (48%)	165.88 135.68/252.87	
Molecular subtypes			
Luminal A	50 (58%)	165.88 133.57/257.96	0.3618
Luminal B HER2-	17 (20%)	188.24 157.13/265.69	
Luminal B HER2+ and non-luminal HER2+	10 (12%)	159.31 137.80/378.48	
Triple negative	9 (11%)	245.32 213.74/284.21	
Tumour diameter			
T1 (2 cm)	60 (70%)	165.88 135.68/242.84	0.0222
T2 (\geq 2cm < 5cm)	26 (30%)	219.71 157.13/286.91	
Nodal status			
N0	66 (77%)	179.23 137.80/270.91	0.5363
N1	20 (23%)	169.26 133.57/255.51	
Stage of disease			
IA	41 (48%)	165.88 137.80/228.10	0.3285
IIA + IIB	45 (52%)	190.52 135.68/268.29	
Elston and Ellis grade			
G1	5 (6%)	240.35 154.96/286.91	0.5264
G2	65 (76%)	174.74 135.68/268.29	
G3	16 (18%)	219.71 131.49/274.95	
Histological type			
Ductal	76 (88%)	174.74 137.80/268.29	0.9023
Lobular	10 (12%)	184.87 135.68/240.35	

A significant difference is denoted by bold P-value.

breast cancer in 70 cases (82%) including those with well- and moderate-differentiated breast carcinomas. There were also 16 patients with poor differentiated cancers (18%). In terms of the

T stage, there were 60 T1 cases (70%) and 26 T2 cases (30%). In terms of the N stage, there were 66 N0 cases (77%) and 20 N1 subjects (23%). In terms of the TNM staging system, there were

Table 4. Vasculogenic and angiogenic biomarkers according to heparanase concentration.

Parameter [units]	Heparanase low concentration (< 140 pg/mL) n = 25	Heparanase moderate concentration (140 – 200 pg/mL) n = 27	Heparanase high concentration (> 200 pg/mL) n = 34	P-values
Circulating EPCs [cell/ μ L]	5.63 2.85/10.55	12.06 5.62/26.63	12.11 6.34/23.02	0.0458
VEGF-A concentration [pg/mL]	54.98 28.16/87.85	59.70 38.68/102.82	93.6 41.02/150.08	0.2037
sVEGFR1 concentration [pg/mL]	38.84 20.67/89.14	52.35 22.46/97.24	22.59 12.86/30.57	0.0011
sVEGFR2 concentration [pg/mL]	8181.14 7470.37/8967.11	9868.01 8358.41/12426.22	10486.90 8962.15/13107.40	0.0108
sVEGFR1/VEGF-A	0.95 0.48/1.27	0.69 0.37/2.32	0.23 0.12/0.50	0.0006
sVEGFR2/VEGF-A	152.14 94.78/242.12	200.64 107.65/241.18	128.63 72.59/219.31	0.4393
sVEGFR2/sVEGFR1	152.76 97.51/392.68	205.94 98.54/493.39	492.15 324.98/1016.78	0.0018

Circulating EPCs, circulating endothelial progenitor cells; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; sVEGFR1, soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 1; sVEGFR2, soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 2. Significant differences are denoted by bold P-values.

41 stage I cases (48%) and 45 stage II cases (52%). The mean diameter of the tumour was 1.50 cm. Of the patients suffering from breast cancer, 84 (97.7%) survived, and eight patients (9.3%) developed disease recurrence. Finally, the relapse-free survival rate was 88.4%.

Interestingly, among breast cancer patients the heparanase concentrations were similar in respect to age, menopausal status and body mass index (BMI) (Table 1). It may suggest that all of these factors did not have an influence on the heparanase concentration.

Tables 2 and 3 presents variabilities in the heparanase concentration in respect to molecular and clinical characteristics. According to the molecular determinants measured by the IHC method there were higher levels of heparanase in oestrogen and progesterone receptor negative cancers ($P = 0.0196$ and $P = 0.0163$, respectively) than in positive ones. Furthermore, based on clinical classification (TNM), a higher concentration of heparanase was noted in T2 cases (tumour diameters $\geq 2 < 5$ cm) than T1 subjects (< 2 cm) ($P = 0.0222$). In addition, there was tendency towards a significance value in respect to the expression of Ki67. Tumours with an overexpression of Ki67 demonstrate a higher concentration of heparanase than tumours with a lower expression of Ki67 ($P = 0.0961$).

Furthermore, we carried out an analysis of VEGF-A, sVEGFR1, sVEGFR2 concentrations, sVEGFR1/VEGF-A and sVEGFR2/VEGF-A ratios as well as the number of circulating endothelial progenitors according to heparanase concentrations. We divided breast cancer patients into three subgroups - with low (< 140 pg/ml), moderate (> 140 and < 200 pg/ml) and high (> 200 pg/ml) concentrations of heparanase. Statistically significant positive associations between circulating EPCs, sVEGFR2 and increasing plasma levels of heparanase were noted ($P = 0.0458$, $P = 0.0108$, respectively). A statistically

significant association between the sVEGFR1 concentration and increasing plasma levels of heparanase was reported. For low and moderate concentrations of heparanase the level of sVEGFR1 increases respectively, but surprisingly for high concentrations of heparanase, the level of sVEGFR1 essentially dropped in regard to low and moderate concentrations of heparanase ($P = 0.0011$). The juxtaposition of the sVEGFR1 and VEGF-A in the ratio (sVEGFR1/VEGF-A) indicates a negative link with heparanase ($P = 0.0006$), since sVEGFR1 presents strong anti-angiogenic properties while VEGF-A is a powerful pro-angiogenic agent. Thus, the anti-angiogenic potential expressed by sVEGFR1/VEGF-A decreased with a simultaneous increase in heparanase concentration. Based on the juxtaposition of both receptors in the ratio sVEGFR2/sVEGFR1, we have shown a positive association of the sVEGFR2/sVEGFR1 ratio with heparanase concentration ($P = 0.0018$) which indicates that in more advanced processes sVEGFR2 is more involved than sVEGFR1 (Table 4).

The ROC curves for separate laboratory determinants were designed and the areas under the curve with 95% confidence interval were specified (AUC, 95% CI thresholds with sensitivity (SE) and specificity (SP)). We appraised the ROC curves in order to estimate the diagnostic accuracies of the investigated variables for the prediction of disease relapse. The borderline of diagnostic usefulness of the test, according to the area under the ROC curve ($AUC^{ROC} \geq 0.5$; $P < 0.05$ was reached only for heparanase and sVEGFR1. Although the AUC^{ROC} for circulating EPCs and VEGF-A were above 0.5, the P values were > 0.05 , thus the Youden Index cut-off points were not determined. Based on the AUC^{ROC} , the Youden index cut-off values were identified to maximise the sum of sensitivity and specificity. Heparanase was the most accurate biomarker with an $AUC^{ROC} = 0.72$ (95% CI: 0.5573 – 0.8754). Using the Youden

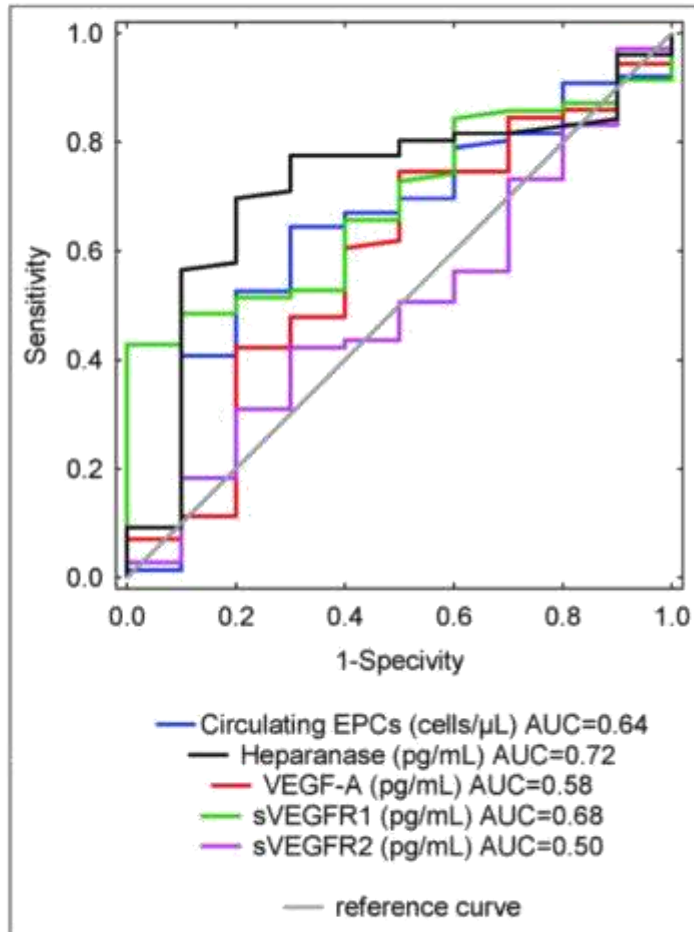


Fig. 1. ROC curves of measured parameters in patients with versus without progression free survival.

index cut-off value, we identified a plasma heparanase concentration of 213.74 pg/mL with a sensitivity of 70% and a specificity of 80% as the best cut-off value to discriminate between disease recurrence patients and those without disease relapse. Additionally, we noticed that the heparanase area under the ROC curve was higher than areas for sVEGFR1 ($AUC^{ROC} = 0.68$, 95% CI: 0.5487 – 0.8213). According to the receiver operating characteristic curve, we defined the Youden index cut-off values for sVEGFR1 in order to distinguish disease recurrence patients and non-disease relapse subjects. Thus, for sVEGFR1 concentrations, the Youden index cut-off value was 37.81 pg/mL with 100% specificity and 43% sensitivity (Fig. 1).

Thus, based on the ROC curves for separate laboratory parameters we designed a ROC curve for the tested model consisting of heparanase, VEGF-A, sVEGFR1, sVEGFR2 concentrations and the number of circulating EPCs. For all the analysed parameters creating this model, the area under the curve was 0.8132 and $P = 0.0064$ (Fig. 2). This model points to a strong diagnostic potential for the prediction of disease progression.

Finally, we performed a Cox's regression model in order to predict which analysed parameters present the diagnostic power

to estimate the recurrence-free survival rate, which takes into account the function of time (Table 5). The strongest predictor values of disease relapse were demonstrated by VEGF-A and the soluble VEGF receptor type 2 in our study population ($P = 0.0303$ and $P = 0.0488$ respectively).

All patients in this study received regular follow-up for 19 to 41 months (median follow-up 33.5 months) after discharge. For the progression-free survival analysis, ten events occurred with a PFS rate of 11.6%. Two (2.3%) patients died during the follow-up period due to systemic metastatic disease. One subject presented a low baseline concentration of heparanase and the second one had a high baseline heparanase level (106.58 pg/mL and 265.69 pg/mL, respectively). More importantly, follow-up revealed a significantly higher incidence of disease relapse in breast cancer patients with high baseline concentrations of heparanase compared with those with low and moderate concentrations of heparanase ($P = 0.0304$). Twenty-five patients (29%) demonstrated a low baseline concentration of heparanase (< 140 pg/mL), whereas 27 patients (31.4%) had a moderate heparanase level (140 – 200 pg/mL) and 34 cases (39.6%) had a high concentration of heparanase (> 200 pg/mL). Recurrence of the disease in the group of patients with a low concentration of heparanase occurred in one out of 25 (4%),

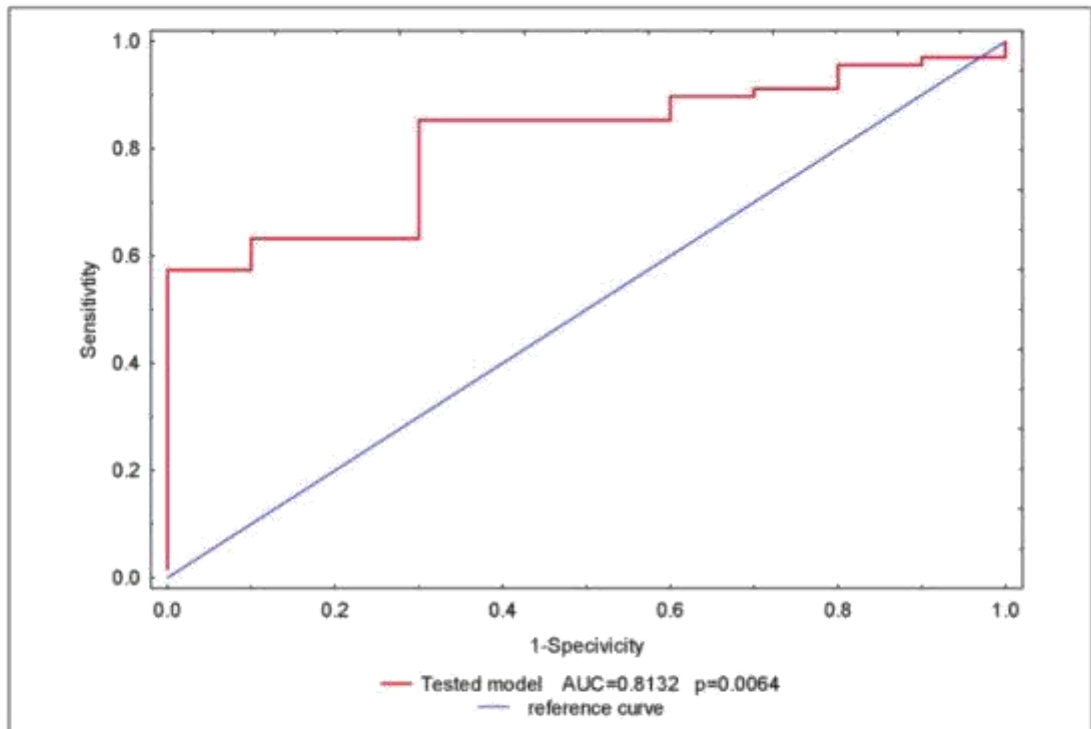


Fig. 2. ROC curves for tested model in patients with versus without disease progression.

Table 5. COXs regression models for progression free survival.

Characteristics	HR	95% CI		P
Heparanase	0.9966	-0.0111	0.0042	0.3793
Circulating EPCs	1.0038	-0.0035	0.0111	0.3026
VEGF-A	1.0087	0.0008	0.0165	0.0303
sVEGFR1	0.9764	-0.0572	0.0095	0.1611
sVEGFR2	0.9996	-0.0007	-0.0001	0.0488

Circulating EPCs, circulating endothelial progenitor cells; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; sVEGFR1, soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 1; sVEGFR2, soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 2. Significant differences are denoted by bold P-values.

with a similar observation noted in patients with a moderate heparanase concentration, where disease relapse happened in one out of 27 (3.7%). However, in the group with a high baseline concentration of heparanase, eight out of 34 (23.5%) cases had a recurrence of the disease. We postulate that a high concentration of heparanase could be predictive of a shorter progressive-free survival (Fig. 3).

DISCUSSION

Breast cancer characteristics are extremely complex in respect to the genetic, molecular, histopathological, prognostic and treatment approaches. In conventional clinical practice, tumour size, histological subtype, tumour grade, stage, lymph node metastasis, and molecular determinants are applied as prognostic markers (19, 20). However, all mentioned tumour-

related features do not successfully predict disease relapse. Interaction between metastasis tumour cells and vascular endothelial cells, lead to alterations in the haemostatic system, disruption of vascular endothelium and finally to tumour cells spread to distant organs (21). The dissemination of tumour cells throughout the body leads to the majority of cancer patient deaths and poses an essential clinical barrier to the solid malignant neoplasm treatment approach.

Heparan sulfate proteoglycans, throughout their co-operations as co-receptors with several bioactive compounds including bFGF, HGF, IL-8, and VEGF control their signalling and distribution. Heparanase is an endo- β -D-glucuronidase with the ability to cleavage the heparan sulfate side chains of the ECM. This property is associated with disintegration of the extracellular matrix by formation of oligosaccharides. Importantly, these 10 – 20 sugar residues exert stronger bioactivity than the native heparan sulphate, leading to stimulation of growth factors,

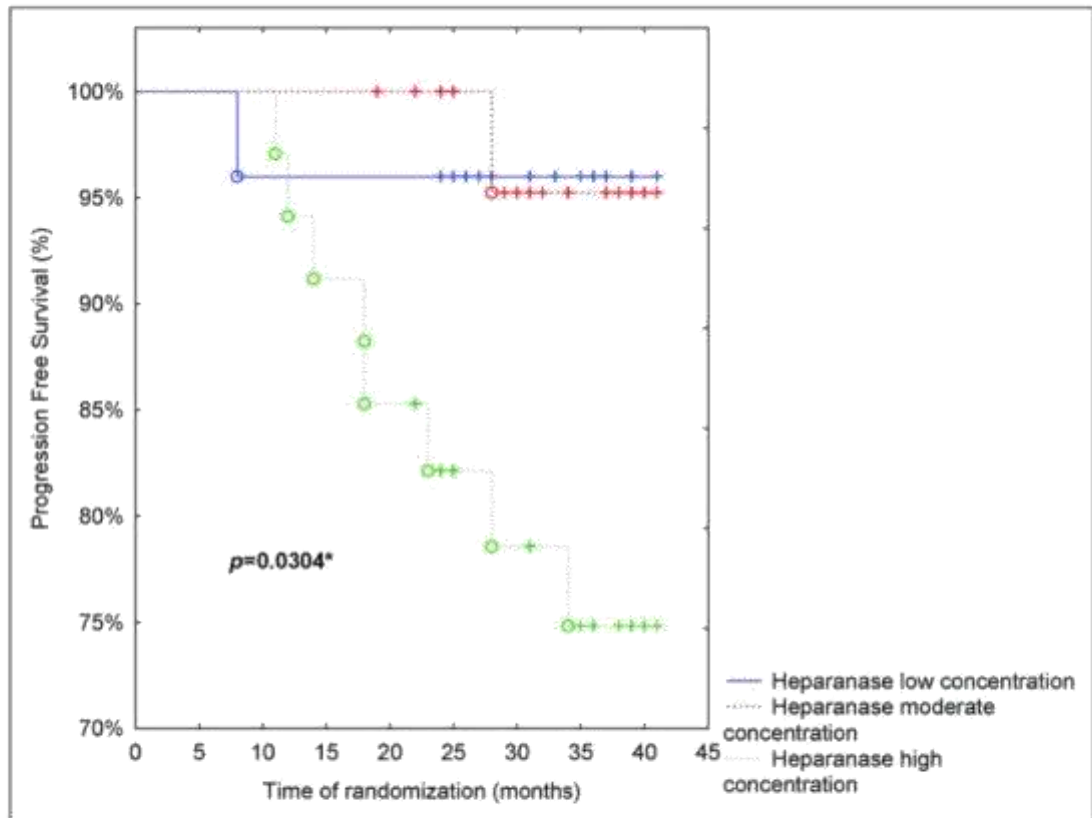


Fig. 3. Kaplan-Meier curve for the progression-free survival (PSF) analysis of the entire population with IBrc according to low, moderate and high heparanase concentration.

cytokines, and angiogenic factors, triggering cell proliferation, cell differentiation and angiogenesis, which induce tumour development as well as tumour cells dissemination (22-24). A high concentration of heparanase is considered to be a negative prognostic biomarker in selected types of cancer (11). There were established that patients with heparanase-positive tumours demonstrated a significantly higher probability of local and distant metastases as well as shorter post-operative survival, in respect to heparanase-negative cases (11, 14).

In our study we observed that the concentration of heparanase varies in accordance to tumour diameter, oestrogen and progesterone receptor expression and slightly with the percentage of Ki67. In our patient population, the mean tumour diameter was 1.5 cm: only 30% of patients had tumours over 2 cm but less than 3.5 cm and in those patients a higher concentration of heparanase was reported, which is consistent with the studies reported by Tang *et al.* (25, 26). Also, they observed in their previous study that heparanase expression was positively connected with a large size of breast cancer tumour, high clinical stage, and lymph node metastasis (26). The authors claim that a high level of heparanase is associated with tumour progression and metastatic ability. Additionally, the authors observed a higher concentration of heparanase in metastatic breast cancer compared with M0 breast cancer, benign disease, and healthy controls. They suggest that heparanase could be used as a potential biomarker for breast cancer recognition, the early phase of tumour spread and worse future outcomes (25).

Furthermore, our studies have shown that the heparanase concentration in hormonal receptor-positive (ER+, PR+) tumours is significantly lower than in tumours with hormone receptor-negative tumours (ER-, PR-). These results confirm the thesis that positive hormone receptor status is associated with a more favourable prognosis in breast cancer patients, due to its lower histological grade, lower degree of nuclear pleomorphism, lower proliferation index and, as a result of our study, lower heparanase concentration and diminished pro-metastatic phenotype. Indeed, hormone receptor-negative breast tumours are less frequently diagnosed, approximately in 25% of all cases. In our study, the ER-negative subgroup consisted of only 11 patients (12.8%) and 17 cases (19.3%) made up the PR-negative subgroup, which is in line with Yersal and Barutca's analysis (20). Negative hormone receptor status with a higher concentration of heparanase is associated with more advanced clinical characteristics and a worse prognosis since the ER/PR negative subgroup of breast cancer is created by a non-luminal HER2+ and a triple negative molecular subtype. Both of these confer more aggressive biological and clinical cancer behaviour. These tumours are highly proliferative, show poor tubule formation, and present a higher histological and nuclear grade (20). Thus, a high concentration of heparanase next to tumour size and oestrogen and progesterone receptor expression may serve as an indicator of a more aggressive character of tumour cells and a shorter survival rate. However, further study of this issue is needed, as Elkin *et al.* (27) determined homologous sequences of an oestrogen response element in the

heparanase gene promoter region and they reported that oestrogen induces transcriptional activity of the heparanase promoter. The authors observed that the oestrogen-dependent increase in heparanase levels led to enhanced neovascularisation. The oestrogen impact on heparanase expression was reported by Elkin *et al.* only in oestrogen receptor-positive, but not in oestrogen receptor-negative, breast carcinoma cell lines (27). Moreover, Cohen *et al.* (28) observed a significant up-regulation of heparanase in primary ER+ breast cancer in respect to the ER-subgroup. The authors claim that the ER-dependent heparanase regulation mechanism works *in vivo*, but the 15% incidence of heparanase expression in ER-negative tumours implies alternative molecular mechanisms are accountable for the increase of heparanase expression in the subgroup of ER-negative breast cancers (28). Most likely, the divergent and controversial results are due to the wide variety of detection methods of heparanase (immunoenzymatic, immunohistochemical staining, RT-PCR analysis) as well as the application of different biological materials (plasma, serum, tissue). Thus, this complicates adequate interpretation of published results.

Additional purpose of the current study was to analyse different plasma heparanase levels (low, moderate, high) in the context of VEGF-A, sVEGFR1, sVEGFR2 concentrations and sVEGFR1/VEGF-A, sVEGFR2/VEGF-A ratios and the number of circulating EPCs in primary, invasive breast cancer patients with early stage (IA-IB) and demonstration of dependencies between them. It is well-established that heparanase stimulates carcinogenesis, angiogenesis, and cancer cell dissemination. The molecular mechanism of these heparanase properties is complex but most likely is based on heparan sulphate proteoglycans degradation, thereby eliminating its activity as an extracellular matrix protector. Moreover, growth factors that are bound by heparan sulphate, such as fibroblast growth factor and VEGF, are released, thus promoting tumour growth and spread. Finally, biologically active heparan sulphate fragments secreted by heparanase action set up a microenvironment that supports tumour cell survival (3, 7, 28). A significant increase in the number of EPCs with a heparanase concentration elevation was noted. Masola *et al.* pointed out that heparanase releases a combination of heparan sulphate-bound growth factors especially VEGF, which support neoangiogenesis. Also, increase of EPCs mobilization, differentiation could be caused by VEGF-dependent enhancement, since VEGF is a powerful EPCs promoter. Neovascularisation is also increased by the non-enzymatic action of heparanase by overexpression of VEGF via p38-phosphorylation and Src kinase (9). From our data, we can suggest that heparanase may mediate the interaction between vasculogenesis and angiogenesis, facilitating cell invasion in the cancer microenvironment. This observation is in line with Vlodavsky *et al.*, (24) which claimed that heparanase not only support tumour spread, but also involves in the angiogenic switch and further cancer growth.

Extremely interesting is the fact that we observed a relevant association between sVEGFR1 concentration and increasing plasma levels of heparanase, but this dependence only persisted for low and moderate concentrations of heparanase. For high concentrations of heparanase, the level of sVEGFR1 essentially was lower in regard to low and moderate concentrations of heparanase. Soluble VEGFR1 presents a high affinity for VEGF-A and acts as a suppressor of the proliferation and migration of endothelial cells and the formation of new blood vessels in the course of malignant tumours (9, 29). Sela *et al.* (9) demonstrated that the soluble form of VEGFR1 is stored in the proximity of the produced cell, despite being a protein secreted outside the cell. Local accumulation of sVEGFR1 is mediated by cell-bound or ECM deposited heparan sulphate, and thus prevention of its systemic release may also be required to avoid massive neutralisation of VEGF in distant organs. Thus, heparan chains of

the extracellular matrix may serve as a natural pool of sVEGFR1 (30). Sela *et al.* noticed that heparanase exerts a specific role in sVEGFR1 release (9). Eddy *et al.* suggest that increase in heparanase level and activity may lead to increased sVEGFR1 in the maternal circulation in preeclampsia cases (30). Our results indicate that lost of sVEGFR1 increasing trend with an elevation of heparanase could be due to the sVEGFR1 overconsumption. Since, heparanase stimulates angiogenic switch, thus a more VEGF is released from endothelial cells as well as cancer cells, thus enhancing angiogenesis, tumour cell dissemination and increases in vessel density. With the elevation of heparanase the over-activation of angiogenesis with a simultaneous reduction of anti-angiogenic properties has been observed. Additionally, we speculate that low sVEGFR1 level in heparanase-high patients is caused by lost of anti-angiogenic capacity by sVEGFR1 due to creation of VEGFR-sVEGFR1 or VEGF-sVEGFR1 complexes.

Additionally, the anti-angiogenic ability expressed by the sVEGFR1/VEGF-A ratio was negatively associated with the heparanase concentration, which indicates on heparanase-dependent negative impact on anti-angiogenic activity of the sVEGFR1. Juxtaposition of both anti- and pro-angiogenic agents may serve as a marker of anti-angiogenic activity. Interestingly, Saito *et al.* (29) observed the stimulation of the sVEGFR1 expression by VEGF-A occurs by the PKC-MEK pathway. Since it is well-established that the primary angiogenic activity of VEGF-A is mainly mediated through VEGFR2 and its downstream PKC-MEK-ERK pathways, these concepts indicate that VEGF-A-induced sVEGFR1 expression may work as a negative feedback axis in order to control angiogenic processes (29). Therefore, it is reasonable to juxtapose these factors with each other, since mutual interactions between these agents have been proven. Saito *et al.* (29) discovered the mechanism through which VEGF-A induces sVEGFR1 in endothelial cells *via* controlling the alternative splicing of the VEGFR1 gene. They suggest a lucid mutual interaction between VEGF-A and its inhibitor - sVEGFR1. Moreover, the lower plasma level of sVEGFR1 may be associated with the creation of the VEGF/sVEGFR1 complexes and may reflect the decreased plasma sVEGFR1 levels. Furthermore, the lower plasma VEGFR1 level with a simultaneous higher concentration of heparanase could be a possible mechanism for VEGF-mediated vascular permeability, due to less VEGF suppression.

Based on the juxtaposition of both receptors in the ratio: sVEGFR2/sVEGFR1, we have shown a positive association of the sVEGFR2/sVEGFR1 ratio with heparanase concentration ($P = 0.0018$), which indicates that in more advanced processes sVEGFR2 is more involved than sVEGFR1, most likely due to sVEGFR1 consumption or by limiting its secretion, since both soluble type 1 and 2 receptors exert anti-angiogenic functions and physiologically prevents vascular permeability (31). It is well-known that the affinity of VEGF for VEGFR2 is 10-fold less than its affinity for VEGFR1. On the other hand, in the case of a higher concentration of heparanase it may be sVEGFR2 takes advantage due to its role in lymph angiogenesis regulation (32). Taken together, our results suggest that vasculogenesis, angiogenesis and tumour cell spread are tightly regulated by the balance between pro- and anti-angiogenic agents as well as heparanase concentration, and that any fluctuations between them have the potential to induce cancer progression.

The Cox regression model consisting of all analysed variables, taking into account the function of time, revealed that VEGF-A and sVEGFR2 have a strong predictive value for disease relapse. However, according to the Kaplan-Meier curves, we can suggest that a high concentration of heparanase above 200 pg/mL may indicate the aggressive character of the tumour and a high possibility of breast cancer metastasis. This suggestion is based on the recurrence rate of 23.5% in those cases. Tang *et al.*'s studies

confirmed our observation that the up-regulation of heparanase concentration is associated with increases in tumour cell metastasis and poor prognosis due to chemo-resistance (25, 26). Our study indicates that the baseline concentration of heparanase may be used as a suitable, non-invasive prognostic biomarker next to tumour size and oestrogen and progesterone receptor expression. Besides that, these results were supported by further statistical analysis (ROC curves), which also indicate that in patients with higher concentrations of heparanase, the higher rate of disease relapse events or death occurs. Heparanase concentration reached the best $AUC^{ROC} = 0.72$ (95% CI: 0.5573 – 0.8754) from all analysed variables. The cut-off value of 213.74 pg/mL with 70% sensitivity and 80% specificity was identified in order to discriminate between disease recurrence patients and those without disease relapse. Furthermore, we performed a ROC curve for the tested model consisting of heparanase, VEGF-A, sVEGFR1, sVEGFR2 concentrations and the number of circulating EPCs. For all the analysed parameters creating this model, the area under the curve was 0.8132. This result points out that pro-vasculogenic, angiogenic agents as well as heparanase may exhibit strong diagnostic power in disease progression prediction.

Taken together, the link between heparanase and vasculogenesis and angiogenesis is crucial in breast cancer progression. Based on our study, we postulate that the concentration of heparanase can predict disease relapse. According to the Yuden index we point out that the cut-off point of 213.74 pg/mL of heparanase concentration assessed in plasma by an immunoenzymatic method may serve as a value which discriminates between disease recurrence patients and those without disease relapse. Additionally, a high concentration of heparanase next to tumour size and oestrogen and progesterone receptor expression may serve as an indicator of a more an aggressive character of tumour cells and a shorter survival rate.

Abbreviations: BC, breast cancer; bFGF, basic fibroblast growth factor; BMI, body mass index; ECM, extracellular matrix; EPCs, endothelial progenitor cells; ER, oestrogen receptors; GAG, glycosaminoglycan; HER2, human epidermal growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; HSPGs, heparan sulfate proteoglycans; IBrC, invasive breast cancer; IHC, immunohistochemical; KGK, keratinocyte growth factor; ki67, proliferative marker; PR, progesterone receptor; SERM, selective oestrogen receptor modulator; sVEGFR1, soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 1; sVEGFR2, soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 2; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; TNM classification: T- tumour, N- node, M- metastasis.

Author contributions: Conceptualization: Kornel Bielawski, Barbara Ruzzkowska-Ciastek, Piotr Rhone; data curation: Barbara Ruzzkowska-Ciastek, Piotr Rhone; formal analysis: Kornel Bielawski; funding acquisition: Kornel Bielawski, Piotr Rhone, Alen Brkic, Danuta Rosc; methodology: Kornel Bielawski, Sylwia Bielawska, Alen Brkic, Barbara Ruzzkowska-Ciastek; resources: Kornel Bielawski, Piotr Rhone, Danuta Rosc; supervision: Barbara Ruzzkowska-Ciastek; validation: Kornel Bielawski, Barbara Ruzzkowska-Ciastek, Alen Brkic; writing - original draft: Kornel Bielawski, Barbara Ruzzkowska-Ciastek; writing - review and editing: Kornel Bielawski and Barbara Ruzzkowska-Ciastek.

Acknowledgments: We would like to thank all of the patients for participating in our study.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Conflict of interests: None declared.

REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394-424.
2. Jena MK, Janjanam J. Role of extracellular matrix in breast cancer development: a brief update. *F1000Research* 2018; 7: 274. doi: 10.12688/f1000research.14133.2.
3. Sun X, Zhang G, Nian J, et al. Elevated heparanase expression is associated with poor prognosis in breast cancer: a study based on systematic review and TCGA data. *Oncotarget* 2017; 8: 43521-43535.
4. Rhone P, Ruzzkowska-Ciastek B, Celmer M, et al. Increased number of endothelial progenitors in peripheral blood as a possible early marker of tumour growth in postmenopausal breast cancer patients. *J Physiol Pharmacol* 2017; 68: 139-148.
5. Yip CH, Rhodes A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncol* 2014; 10: 2293-301.
6. Kiskova T, Demeckova V, Jendzelkova Z, et al. Nocturnal resveratrol administration inhibits chemically induced breast cancer formation in rats. *J Physiol Pharmacol* 2017; 68: 867-875.
7. Theodoro TR, Matos LL, Cavalheiro RP, Justo GZ, Nader HB, Pinhal MA. Crosstalk between tumor cells and lymphocytes modulates heparanase expression. *J Transl Med* 2019; 17: 103. doi: 10.1186/s12967-019-1853-z.
8. Masola V, Bellin G, Gambaro G, Onisto M. Heparanase: a multitasking protein involved in extracellular matrix (ECM) remodeling and intracellular events. *Cells* 2018; 7: 236. doi: 10.3390/cells7120236
9. Sela S, Natanson-Yaron S, Zeharia E, Vlodavsky I, Yagel S, Keshet E. Local retention versus systemic release of soluble VEGF receptor-1 are mediated by heparin-binding and regulated by heparanase. *Circ Res* 2011; 108: 1063-1070.
10. Gomes AM, Stelling MP, Pavao MS. Heparan sulfate and heparanase as modulators of breast cancer progression. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 852093. doi: 10.1155/2013/852093
11. Vornicova O, Naroditsky I, Boyango I, et al. Prognostic significance of heparanase expression in primary and metastatic breast carcinoma. *Oncotarget* 2017; 9: 6238-6244.
12. Nagarajan A, Malvi P, Wajapeyee N. Heparan sulfate and heparan sulfate proteoglycans in cancer initiation and progression. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9: 483. doi: 10.3389/fendo.2018.00483.
13. Gutter-Kapon L, Alishekevitz D, Shaked Y, et al. Heparanase is required for activation and function of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113: E7808-E7817.
14. Nadir Y, Brenner B. Heparanase multiple effects in cancer. *Thromb Res* 2014; 133 (Suppl. 2): S90-S94. doi: 10.1016/S0049-3848(14)50015-1
15. Hammond E, Khurana A, Shridhar V, Dredge K. The role of heparanase and sulfatases in the modification of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment and opportunities for novel cancer therapeutics. *Front Oncol* 2014; 4: 195. doi: 10.3389/fonc.2014.00195
16. Vlodavsky I, Beckhove P, Lerner I, et al. Significance of heparanase in cancer and inflammation. *Cancer Microenviron* 2012; 5: 115-132. doi: 10.1007/s12307-011-0082-7
17. Gao M, Yao Q, Liu Y, Sun F, Ma Y, Sun G. Association between mobilization of circulating endothelial progenitor cells and time or degree of injury from angioplasty in patients with exertional angina: a prospective study. *Exp Ther Med* 2015; 10: 809-815.
18. Zarychta E, Rhone P, Bielawski K, Michalska M, Rosc D, Ruzzkowska-Ciastek B. Anti-angiogenic efficacy in invasive

- breast carcinoma patients depends on clinicopathological determinants. *Adv Med Sci* 2019; 64: 216-223.
19. Kondov B, Milenković Z, Kondov G, *et al.* Presentation of the molecular subtypes of breast cancer detected by immunohistochemistry in surgically treated patients. *Open Access Maced J Med Sci* 2018; 6: 961-967.
 20. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol* 2014; 5: 412-424.
 21. Kij A, Kus K, Smeda M, *et al.* Differential effects of nitric oxide deficiency on primary tumour growth, pulmonary metastasis and prostacyclin/thromboxane A₂ balance in orthotopic and intravenous murine models of 4T1 breast cancer. *J Physiol Pharmacol* 2018; 69: 911-919.
 22. Sanderson RD, Yang Y, Kelly T, MacLeod V, Dai Y, Theus A. Enzymatic remodeling of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment: growth regulation and the prospect of new cancer therapies. *J Cell Biochem* 2005; 96: 897-905.
 23. Chute C, Yang X, Meyer K, *et al.* Syndecan-1 induction in lung microenvironment supports the establishment of breast tumor metastases. *Breast Cancer Res* 2018; 20: 66. doi: 10.1186/s13058-018-0995-x
 24. Vlodavsky I, Elkin M, Abboud-Jarrous G, *et al.* Heparanase: one molecule with multiple functions in cancer progression. *Connect Tissue Res* 2008; 49: 207-210.
 25. Tang D, Piao Y, Zhao S, *et al.* Expression and correlation of matrix metalloproteinase-9 and heparanase in patients with breast cancer. *Med Oncol* 2014; 31: 26. doi: 10.1007/s12032-014-0026-4
 26. Tang D, Zhang Q, Zhao S, *et al.* The expression and clinical significance of microRNA-1258 and heparanase in human breast cancer. *Clin Biochem* 2013; 46: 926-932.
 27. Elkin M, Cohen I, Zcharia E, *et al.* Regulation of heparanase gene expression by estrogen in breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 8821-8826.
 28. Cohen I, Maly B, Simon I, *et al.* Tamoxifen induces heparanase expression in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4069-4077.
 29. Saito T, Takeda N, Amiya E, *et al.* VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. *FEBS Lett* 2013; 587: 2179-2185.
 30. Eddy AC, Chapman H, George EM. Heparanase regulation of sFLT-1 release in trophoblasts in vitro. *Placenta* 2019; Jul 9: S0143-4004(19)30514-4. doi: 10.1016/j.placenta.2019.07.004
 31. Pal E, Korva M, Resman Rus K, *et al.* Relationship between circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Emerg Microbes Infect* 2018; 7: 89. doi: 10.1038/s41426-018-0090-5
 32. Pavlakovic H, Becker J, Albuquerque R, Wilting J, Ambati J. Soluble VEGFR-2: an antilym- phangiogenic variant of VEGF receptors. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1207: E7-E15.

Received: May 21, 2019

Accepted: June 28, 2019

Author's address: Dr. Kornel Bielawski, Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum in Bydgoszcz, 9 Skłodowskiej-Curie Street, 85-094 Bydgoszcz, Poland.
E-mail: kornel-bielawski@wp.pl

Wprowadzenie do badania opublikowanego w pracy nr 2:

Bielawski K, Rhone P, Balsa M, Ruszkowska-Ciastek B. Pre-Operative Combination of Normal BMI with Elevated YKL-40 and Leptin but Lower Adiponectin Level Is Linked to a Higher Risk of Breast Cancer Relapse: A Report of Four-Year Follow-Up Study. *J Clin Med.* 2020;9(6):1742. **IF: 4,241; punktacja MNiSW: 140 pkt.**

Zarówno rak piersi jak i otyłość są najbardziej rozpowszechnionymi chorobami w populacji kobiet na całym świecie. Dodatkowo warto zwrócić uwagę, że otyłość jest dobrze poznanym czynnikiem ryzyka wystąpienia nowotworów takich jak rak szyjki macicy, jajnika, endometrium oraz piersi. Jedna na dwie kobiety z rakiem piersi ma nadwagę lub otyłość. Ponadto otyłość jest związana z występowaniem bardziej agresywnych fenotypów raka piersi. Obecnie podstawowe mechanizmy biologiczne, które łączą otyłość z rakiem piersi skupiają się w dużej mierze na nadmiernej ekspozycji gruczołów sutkowych na zmieniony prozapalnie profil adipokin jak również nadmierne wydzielanie estrogenów, cytokin i mediatorów prozapalnych oraz czynników wzrostu.

Przewlekły stan zapalny niskiego stopnia jest częstą cechą nadwagi i otyłości. Obiecującym biomarkerem wydaje się być białko YKL-40, które zapobiega apoptozie i promuje proliferację komórek nowotworowych poprzez zwiększenie aktywności antyapoptotycznej lub proproliferacyjnej. Badania sugerują, że YKL-40 raczej stanowi biomarker stanu zapalnego niż czynnik sprawczy zmian nowotworowych.

W **publikacji numer 2** badaniem zostało objętych 81 pacjentek z nowo zdiagnozowanym jednostronnym inwazyjnym nowotworem piersi w stopniu zaawansowania IA-IIIB, których mediana wieku wynosiła 54 lata (Q1/Q3 – 49/59 lat). Ponad połowa pacjentek (53%) miała nadwagę lub otyłość. Pacjentki znajdowały się pod opieką personelu Oddziału Klinicznego Nowotworów Piersi i Chirurgii Rekonstrukcyjnej Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy. Wszystkie zakwalifikowane pacjentki po zabiegu operacyjnym zostały objęte regularną obserwacją. Mediana okresu obserwacji wynosiła 44 miesiące (Q1/Q3: 37/48 miesięcy). Odnotowano 11 zdarzeń (13,58%), w tym 3 nawroty regionalne, 3 przerzuty odległe oraz 5 zgonów. Główne kryteria włączenia i wyłączenia były tożsame z kryteriami zastosowanymi w badaniu opublikowanym w pracy nr 1.

Pod względem rodzaju histologicznego najczęściej występującym nowotworem piersi był inwazyjny rak przewodowy (IDC) (69 pacjentek). W grupie badanej mediana średnicy guza wynosiła 1,67 cm (Q1/Q3 – 1,2/2,1 cm). Natomiast brak zajęcia węzłów chłonnych występował u 62 pacjentek.

W ramach badania oceniano stężenie adiponektyny, leptyny i białka YKL-40 z zastosowaniem testów immunoenzymatycznych. Oznaczono także aktywność czynnika tkankowego (TF) za pomocą testu chromogenego.

Celem badania nr 2 była analiza stężeń YKL-40, leptyny, adiponektyny oraz aktywności TF w zależności od występowania wybranych cech demograficznych, antropometrycznych, molekularnych oraz kliniczno-patologicznych u pacjentek z inwazyjnym jednostronnym nowotworem piersi. Dodatkowo celem badania była ocena związku między wskaźnikiem masy ciała BMI przed leczeniem, stężeniami YKL-40, leptyny, adiponektyny oraz aktywnością TF a rokowaniem wyrażonym jako czas wolny od nawrotu choroby nowotworowej.

W drugiej publikacji w wyniku przeprowadzonych analiz statystycznych w zależności od wartości BMI odnotowano najwyższe stężenie leptyny oraz najniższe stężenie adiponektyny wśród pacjentek z otyłością. Wykazano również wyższe stężenia adiponektyny wśród pacjentek, które miały 1 lub 2 dzieci w porównaniu do grupy pacjentek, które miały 3 dzieci. Natomiast stężenie YKL-40 było wyższe w grupie pacjentek mających 1 dziecko w porównaniu zarówno do grupy pacjentek mających 2 jak i 3 dzieci.

Ze względu na charakterystykę molekularną guza stwierdzono niższe stężenie adiponektyny wśród pacjentek z ekspresją markera proliferacji komórkowej Ki67 powyżej lub równą 20% w porównaniu do grupy z ekspresją poniżej 20%. Analiza uzyskanych wyników ze względu na występowanie wybranych cech kliniczno-patologicznych wykazała wśród pacjentów z przewodowym typem nowotworu piersi wyższe stężenia YKL-40 i leptyny oraz niższe stężenie adiponektyny w porównaniu do pacjentów ze zrazikowym typem nowotworu piersi. Odnotowano wyższe stężenie adiponektyny w przypadku występowania podtypu luminalnego A w porównaniu do występowania podtypu potrójnie ujemnego. Aktywność czynnika tkankowego również różniła się w zależności od podtypu molekularnego i była najwyższa w podgrupie z luminalnym B HER2- nowotworem piersi.

W wyniku przeprowadzonej wieloczynnikowej regresji Cox'a stwierdzono, że aktywność czynnika tkankowego, stężenia leptyny i adiponektyny oraz wartość BMI stanowią istotne czynniki predykcyjne nawrotu choroby. Niższe wartości BMI i stężenia adiponektyny 86

oraz wyższe stężenia leptyny i aktywności TF, były związane z wyższym ryzykiem nawrotów choroby. Analiza krzywej ROC również potwierdziła silny potencjał prognostyczny modelu składającego się z pięciu analizowanych w tej pracy biomarkerów w przewidywaniu nawrotu choroby.

Na podstawie krzywych przeżycia Kaplana-Meiera odnotowano znacznie większą częstość nawrotu choroby w grupie pacjentek z wysoką aktywnością TF wynoszącą > 24 pM oraz wśród pacjentek z wysokim stężeniem YKL-40 wynoszącym $> 2,50$ ng/ml w porównaniu do podgrup z niskimi i średnimi wartościami tych parametrów. Ponadto stwierdzono krótszy czas przeżycia bez nawrotu choroby w grupie pacjentek z BMI < 25 kg/m² w porównaniu do grupy pacjentek, których BMI wynosiło 25-30 kg/m².

Dodatkowo przeanalizowano stężenia lub aktywność badanych parametrów wśród ośmiu kobiet z prawidłową masą ciała (BMI < 25 kg/m²), u których wystąpił nawrót choroby. Grupa ta charakteryzowała się najwyższym stężeniem YKL-40, najwyższą aktywnością TF oraz najniższym stężeniem adiponektyny.

Ponadto u pacjentek z wysokim stężeniem leptyny $> 12,58$ ng/ml wykazano istotnie większą częstość nawrotów choroby w podgrupie z BMI < 25 kg/m² w porównaniu do podgrupy z BMI > 25 kg/m². Podobną zależność stwierdzono również wśród pacjentek z niskim stężeniem adiponektyny $< 27,05$ ng/ml.

Z badania wynika, że połączenie wysokiego przedleczeniem stężenia YKL-40 lub wysokiego przedleczeniem stężenia leptyny w surowicy z prawidłowym BMI, a także połączenie prawidłowego BMI z niskim stężeniem adiponektyny wiążą się z niekorzystnym rokowaniem. Dodatkowo, wysokie stężenie YKL-40 jak również wysoka aktywność TF były związane z gorszym rokowaniem w trakcie czteroletniej obserwacji. Uzyskane wyniki badań opublikowanych w pracy nr 2 sugerują, że pacjentki z rakiem piersi i nadwagą mają lepsze rokowanie niezależnie od stężenia YKL-40, leptyny i adiponektyny. Stwierdzono około trzykrotne zwiększenie ryzyka nawrotu choroby lub zgonu kobiet o prawidłowej masie ciała w porównaniu do grupy kobiet z nadwagą.

Article

Pre-Operative Combination of Normal BMI with Elevated YKL-40 and Leptin but Lower Adiponectin Level Is Linked to a Higher Risk of Breast Cancer Relapse: A Report of Four-Year Follow-Up Study

Kornel Bielawski ¹, Piotr Rhone ², Marek Balsa ³  and Barbara Ruszkowska-Ciastek ^{1,*} 

¹ Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum in Bydgoszcz, 85-094 Bydgoszcz, Poland; kornel-bielawski@wp.pl

² Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre Prof. F. Łukaszczyk Memorial Hospital, 85-796 Bydgoszcz, Poland; prhone@wp.pl

³ Department of Health Sociology and Healthy Behaviours, Faculty of Humanities, University of Szczecin, 71-017 Szczecin, Poland; marekbalsa@wp.pl

* Correspondence: ruszkowska.basia@gmail.com; Tel.: +48-52-585-35-91

Received: 28 April 2020; Accepted: 2 June 2020; Published: 4 June 2020



Abstract: Adipokines are powerful agents involved in the development of obesity-dependent cancers. This prospective study aimed to investigate the association between pre-treatment body mass index (BMI) and serum YKL-40, leptin, and adiponectin concentrations as well as the plasma activity of tissue factor (TF) and the future prognosis of early, non-metastatic breast cancer (BrC) subjects. The serum levels of YKL-40, leptin, and adiponectin as well as plasma TF activity, anthropometric parameters, and clinicopathological parameters were analysed in 81 treatment-naïve females with invasive BrC. The predictive value of YKL-40, BMI, leptin, adiponectin, and TF was determined with a 95% confidence interval (CI). Kaplan–Meier plots and log-rank and F Cox tests were used to determine the clinical outcomes of progression-free survival (PFS). The median follow-up duration was 44 months with complete follow-up for the first event. Follow-up revealed a significantly higher incidence of disease relapse in BrC patients with a high baseline concentration of YKL-40 (22.22%) and TF activity (21.43%). Body mass index was an independent predictor of survival, with women who were overweight/obese being less prone to relapse (hazard ratio (HR): 0.75; 95% CI: 0.59 to 0.95). The recurrence rates for normal-weight BrC cases was 21.05% versus 7.14% for their overweight counterparts. The receiver operating characteristic analysis showed the strong ability of the analysed biomarkers to predict disease progression, with an area under the receiver operating characteristics (ROC) curve of 0.84 (95% CI, 0.823 to 0.931). In a prospective cohort of invasive BrC patients, overweight/obesity was associated with improved future outcomes. The combination of a normal BMI with high leptin and low adiponectin levels and high TF activity was associated with an increased risk of recurrence and decreased survival.

Keywords: inflammation; adipokines; breast cancer; disease recurrence

1. Introduction

It is well-established that breast cancer (BrC) and obesity are the most widespread diseases in the female population, all over the world. There is no doubt that obesity is a well-identified risk factor for cervical, ovarian, endometrial, and breast cancer, and it is associated with 88% mortality rates in females [1,2]. Interestingly, one in two breast cancer women are overweight or obese [2]. Obesity leads to increased susceptibility for postmenopausal luminal breast cancers, but premenopausal obese

women are more prone to developing a basal-like breast cancer (BLBC). Furthermore, adiposity is associated with a more aggressive breast cancer phenotype, including larger tumours, more often with nodal metastases and worse prognosis [3–6]. Thus, adiposity is linked with both cancer predisposition and cancer-dependent death [7].

Against this background, prognostic indicators in patients with breast cancer are fundamental. Since BrC is a very heterogeneous disease with well-defined morphologies, molecular attributes, prognoses, and treatment options, clinical decisions are mainly made on the basis of the tumour stage, lymph-node status, and the expression of molecular determinants, represented clinically by oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and the proliferation marker Ki67 [8]. There is a five-year survival rate of 100%, 93%, 72%, and 26% for stages I, II, III, and IV, respectively [9]. Thus, the early diagnosis of breast cancer has great clinical prominence.

Nowadays, the underlying biological mechanisms that link obesity to BrC have largely focused on the excessive exposure of the mammary glands to the abundant secretion of oestrogen, cytokines, pro-inflammatory mediators, and growth factors, along with an altered adipokine profile, all of which are believed to be involved in the promotion, invasion, and metastasis of cancer cells. Normal adipose tissue and mature adipocytes, especially, produce the insulin-sensitising, anti-inflammatory, anti-atherogenic, and anti-proliferative hormone, adiponectin, and a low amount of the pro-angiogenic, pro-mitogenic leptin as well as a low quantity of pro-inflammatory cytokines [3,10]. However, adiposity leads the way in a pivotal shift towards the up-regulation of leptin in parallel to the down-regulation of adiponectin and overproduction of pro-inflammatory M1 macrophages [2,3,11,12].

The additional threat of neoplasm is a pro-coagulant state, in which the enhancement of coagulation is linked to malignant transformation via tumour cell growth, migration, angiogenesis, and extravasation. Cancer-associated overexpression of tissue factor (TF) and thrombin has been noted. Interestingly, TF can also be released under the influence of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) in soluble form. Thus, these pro-inflammatory agents are incident to the hypercoagulability state. On the other hand, tumour cells produce TNF- α and IL-1 β , which activate pro-angiogenic growth factors to cause enhanced tumour growth [7,13]. Summarising, the malignant process, inflammation and the pro-coagulant state are inseparably connected with each other to create the “self-powered machine”.

Chronic low-grade inflammation is a common attribute of adiposity and cardiovascular complications [7,13]. The contributions of the local immune response and systemic inflammation in cancer initiation and invasion have been confirmed [14]. A promising biomarker for predicting the risk of BrC recurrence is an inflammatory protein named YKL-40, also called human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39) and chitinase 3-like 1 protein (CLP). YKL-40 is secreted by leukocytes, tumour cells, and tumour-related macrophages. Il-6 and hypoxia induce YKL-40 synthesis [14–18]. The serum and plasma levels of YKL-40 are associated with poor clinical outcomes in breast, lung, prostate, liver, bladder, colon, and other types of tumours [14–18]. YKL-40 prevents apoptosis and promotes malignant cell proliferation by the up-regulation of anti-apoptotic or pro-proliferative, pro-angiogenic factors. In severe infections, increases in plasma YKL-40 are noted before rises in the plasma C-reactive protein [18]. Interestingly, Kjaergaard et al. suggest that plasma YKL-40 is not a causal agent of neoplastic changes but rather an inflammatory biomarker [14].

It is crucial to recognise the association between adiposity and the activation of TF-dependent coagulation and inflammatory reactions and to elucidate their importance in malignant transformation. Thus, the purpose of the present study was to assess the association between pre-treatment body mass index (BMI), serum YKL-40, leptin, adiponectin concentrations, the plasma activity of TF, and the future prognosis for early, non-metastatic BrC subjects.

2. Material and Methods

2.1. Compliance with Ethical Standards

Written informed consent was received from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki. Subjects could withdraw from the study before or at any time during the study. The present research protocol was approved by the local bioethical committee (permission no. KB 547/2015; 16.06.2015).

2.2. Description of the Patients' Cohort

Eighty-one consecutive female subjects with newly diagnosed, histologically-confirmed invasive BrC were enrolled in this study. The median age at inclusion was 54 years (interquartile range, 49–59 years). The participants were enrolled in the study before systemic adjuvant treatment. Since the levels of adipokines and pro-inflammatory markers may vary with advancement of disease, only patients with Stage I and II disease (according to the AJCC classification of 2016) were included in the present series (Stage I, $n = 40$; Stage II, $n = 41$). The patients were under the care of the medical staff from the Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Center Prof. F. Łukaszczyk Memorial Hospital, Bydgoszcz, Poland.

2.3. Inclusion and Exclusion Criteria

The inclusion criteria of the study were as follows: (1) the diagnosis of primary, unilateral, invasive BrC; (2) complete clinical record and follow-up data; (3) all the peripheral blood samples were obtained within 24 h before surgery; and (4) proper haematological, liver, and renal function. The exclusion criteria for the patients included: (1) bilateral BrC; (2) a tumour larger than 5 cm; (3) Stage IIIA or higher; (4) neoadjuvant chemotherapy, radiotherapy, or endocrine therapy; (5) a previous diagnosis of any cancer type; (6) distant metastasis; (7) chronic inflammatory diseases or autoimmune disease; (8) a carcinoma in situ; (9) morbid obesity (BMI over 40 kg/m²); (10) diabetes mellitus type 2; (11) psychiatric illness; and (12) male gender.

2.4. Collection of Clinical Data

All of the study participants underwent a personal interview administered by oncologists in the hospital. Data were collected on the sociodemographic characteristics (such as age and education), menstrual and reproductive history, menopausal status, menopausal hormone therapy, lifestyle behaviours, and medical history as well as the history of breast and other cancers using a standardised lifestyle questionnaire. Postmenopausal status was identified in the current study as the absence of a menstrual cycle for 12 months after the last menstruation. Body mass index (BMI) (weight in kg/height in m²) was calculated from the patient's height and weight, measured at the initial patient visit, when the individuals were wearing no shoes and few clothes. Tumour histology and size; lymph-node status; tumour staging; and immunohistochemistry (IHC) of the oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2), Ki67- proliferation marker, and E-cadherin were determined. The Nottingham histological grade of malignancy (the Elston-Ellis modification of the Scarff-Bloom-Richardson grading system) was established, based on three components: (1) the amount of tubule formation, (2) the nuclear grade, and (3) the mitotic rate. The tumour size was defined by the maximum diameter of the sample. The tumor (T)/node (N)/metastasis (M) stage of the disease at the initial diagnosis was confirmed by the American Joint Committee on Cancer (AJCC), 7th Edition. The histological type was classified as ductal carcinoma or lobular carcinoma according to the WHO Classification of Tumours. The intrinsic subtypes of BrC were divided into luminal A, luminal B HER2-positive, luminal B HER2-negative, non-luminal HER2-positive, and basal-like.

2.5. Follow-Up Details

All the included patients had post-operative inpatient or outpatient follow-up every three months for the first and second years, and every six months for the third and fourth years after surgery. For the progression-free survival analysis, 11 events were recorded, including 3 (3.7%) loco-regional recurrences, 3 (3.7%) distant metastases, and 5 (6.17%) deaths. The median follow-up time after the index date was 44 months with a 13.58% recurrence rate. Follow-up evaluation included laboratory tests (blood biochemical test), physical examination (breast and lymph-node palpation), breast ultrasonography, liver ultrasound, mammography, and other suitable examinations. Relapse was defined as signs of metastatic disease or local recurrence confirmed by PET/CT or death (excluding deaths unrelated to the disease).

2.6. Blood Sampling and Laboratory Tests

Venous blood (4.5 mL) for testing TF activity was collected into cooled tubes (Becton Dickinson Vacutainer® System, Plymouth, UK) containing 0.13 mol/L of trisodium citrate (final blood anticoagulant ratio, 9:1). Additionally, the blood was collected into 4.0 mL tubes (Becton Dickinson Vacutainer® System, Plymouth, UK) without anticoagulant in order to determine the concentrations of adiponectin, leptin, and YKL-40. Blood samples from all patients were obtained within 24 h before surgery procedures, when patients had been in a fasting state; after 30 min of rest and after a 12 h overnight fast, blood sampling took place between 7.00 a.m. and 9.00 a.m., to minimise diurnal variability. The samples were processed according to the standard conditions for blood samples. All clinicopathological data were obtained as part of routine care. All the blood samples were stored at -80°C until analysis. The blood samples were centrifuged at $3000\times g$ for 15 min. There was no variation in the average storage time between the case samples. For all kits, the reaction mixture was added to in a 96-well plate. The laboratory assistants were blinded to the study population.

2.7. Serum Leptin Measurement

The baseline serum leptin concentration was measured using a commercially available kit—Human Leptin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Clinical Range (BioVendor Research and Diagnostic products, Brno, Czech Republic; catalogue number: RD191001100)—in accordance with the manufacturer's instructions. The limit of leptin detection was 0.2 ng/mL. The intra-assay coefficient of variation (within-run) was 5.9% with an inter-assay coefficient of variation (run-to-run) of 5.6%. The subjects were separated as having low or high values, dichotomised using a cut-off for leptin of 12.58 ng/mL, based on the median value for the whole study population.

2.8. Serum Adiponectin Analysis

The pre-treatment serum adiponectin level was determined by a human adiponectin ELISA high sensitivity ELISA kit, (BioVendor Research and Diagnostic products, Brno, Czech Republic; catalogue number: RD191023100). The limit of adiponectin detection was 0.47 ng/mL and had an intra-assay coefficient of variation (within-run) within 3.9% and an inter-assay coefficient of variation (run-to-run) of 6.0%. Patients were divided as having low or high values, dichotomised using a cut-off for adiponectin of 27.05 ng/mL, based on the median for the whole study population.

2.9. Serum YKL-40 Assay

The baseline serum YKL-40 protein concentration was assessed with a Human Chitinase 3-like 1 ELISA kit (BioVendor Research and Diagnostic products, Brno, Czech Republic; catalogue number: RD193444200CS). The minimal detectable limit for YKL-40 was 10 ng/mL. The intra-assay coefficient of variation (CV) was 5%, and the inter-assay CV was <6%. Patients were grouped as having low or high values, dichotomised using a cut-off for YKL-40 of 1.93 ng/mL, based on the median value for the whole study population. Additionally, the YKL-40 concentration was categorised either as low

(<1.60 ng/mL), moderate (1.60–2.50 ng/mL), or high (>2.50 ng/mL) based on the assumption to create three numerically equal subgroups; each group consisted of 27 cases.

2.10. Citrate Plasma TF Activity

The plasma activity of TF was measured using chromogenic assays, the ACTICHROME®TF test (Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, CT, USA; catalogue number: 846). The minimal detectable limit for TF activity was 2 pM. The standard range was set at 0–30 pM. Patients were grouped as having low or high values, dichotomised using a cut-off for TF of 14.18 pM, based on the median value for the whole study population. Additionally, TF activity was categorised either as low (<12 pM), moderate (12–24 pM), or high (>24 pM) based on the assumption to create three equal subgroups; the first group consisted of 26 cases, the second was made up of 27 patients, and the third was composed of 28 subjects (there were 28 patients in the third group due to the fact that two patients had the same results).

2.11. Immunohistochemical Detection of Hormone Receptors, Ki67, and HER2

The measurements of hormone receptors including ER and PR as well as HER2 and Ki67 were performed by the immunohistochemistry method according to the manufacturer's indications. To define ER and PR status, immunostaining using anti-ER (clone SP1) and anti-PR (clone 1E2) pre-diluted monoclonal antibodies (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) was applied. For the demonstration of the Ki67 antigen in the specimens, monoclonal mouse antibody (Autostainer Link 48, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used. For the semi-quantitative detection of HER2, the rabbit monoclonal primary antibody VENTANA anti-HER2/neu (clone 4B5) was used.

The immunostaining for ER, PR, and Ki67 was quantified and expressed as percentages of immunostained neoplastic cells. We used 20% as the threshold value to judge the level of Ki67 expression. For HER2, strong complete membrane staining in more than 10% of tumour cells was defined as positive expression (3+). Scores of 0 and 1 were established as negative expression, and all tumour cells with a 2+ score were further tested by fluorescence in situ hybridisation [19]. Based on the expression of molecular determinants, all subjects were classified according to the St. Gallen 2013–15 recommendations.

2.12. Statistical Methods

The Shapiro–Wilk test was used to test normality, and the Mann–Whitney test and the ANOVA Kruskal–Wallis test were used to compare subgroups. The non-normally distributed variables were described by medians and interquartile ranges (IQR). The clinicopathologic categorical variables were presented as numbers and percentages (%). The Kaplan–Meier product limit estimator method was used to determine the survival time of PFS. The log-rank test and the F Cox test were used to check the dependence of patients' survival on single or on combinations of variables. The multivariate Cox proportional hazards regression model was used to estimate the hazard ratios (HRs) and the 95% confidence intervals (CIs) for the associations between the serum YKL-40, leptin, and adiponectin levels as well as the plasma TF activity and the progression-free survival. A 95% confidence interval (95% CI) was set as the criterion to establish statistical significance. Finally, to evaluate the biomarkers' ability to predict disease recurrence, analysis of the receiver operating characteristics curve (ROC) by the area under the curve (AUC) was performed according to the logistic regression model. Differences with *p*-values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Clinical Summarisation of the Study Population

Between November 2015 and January 2018, from a total of 92 newly diagnosed and treatment-naïve BrC subjects, 81 patients fulfilled the inclusion/exclusion criteria and were prospectively included in the study. Tables 1–3 summarise the study group according to anthropometric, demographic,

and clinicopathological features as well as biochemical parameters. All cases were females, and the median age was 54 years (interquartile range (IQR): 49–59 years). The median BMI was 25.22 kg/m² (IQR: 23.05–28.90 kg/m²). More than half (53%) of the cases were overweight or obese. The median follow-up for the entire cohort was 44 (IQR: 37–48) months, with complete data for the cause and date of death. All 81 patients underwent surgery, 13 cases underwent mastectomy, and 68 cases underwent breast-conserving surgery. In terms of the histological pathology, 69 patients had invasive ductal carcinoma (IDC) and 12 patients had invasive lobular carcinoma (ILC). Fifty (62%) BrC subjects had a luminal-A intrinsic subtype. The most common histological grades according to Elston–Ellis classification were highly (G1) and moderately differentiated carcinomas G2 (80%). The median tumour diameter was 1.67 cm (IQR: 1.2–2.1 cm). More than the 75% of cases were free of nodal involvement.

Table 1. The biomarker concentrations according to the demographic and anthropometrical determinants in the study population.

Variables/Number of Patients (%)	YKL-40 Concentration (ng/mL)	TF Activity (pM)	Leptin Concentration (ng/mL)	hsAdiponectin Concentration (ng/mL)
81 (100%)	1.93 1.43/2.83	14.18 11.59/26.92	12.58 4.70/20.64	27.05 20.63/32.10
Age				
<55 years n = 41 (51%)	1.87 1.44/2.81	15.20 12.31/28.76	8.77 4.43/18.26	25.24 19.76/29.09
≥55 years n = 40 (49%)	2.01 1.42/3.25	13.64 11.10/26.40	12.65 5.46/23.58	28.07 23.25/32.63
Menopausal status				
Premenopausal n = 27 (33%)	1.89 1.33/2.81	17.59 12.31/25.20	7.80 4.00/19.21	25.24 19.76/30.30
Postmenopausal n = 54 (67%)	1.96 1.45/2.85	13.79 11.17/29.59	12.67 5.57/22.47	27.42 22.62/32.31
Body mass index			***	I vs. III *
18.5–24.9 kg/m ² n = 38 (47%)	1.91 1.36/2.85	16.29 11.77/29.59	5.30 3.12/11.56	28.19 23.88/33.63
25.0–29.9 kg/m ² n = 28 (35%)	1.85 1.43/2.54	14.01 11.73/25.38	14.31 8.70/21.63	27.02 19.28/32.12
30.0–39.9 kg/m ² n = 15 (18%)	2.35 1.78/2.90	15.20 9.02/38.2	25.72 16.92/40.85	24.44 16.93/27.91
Number of parity	II vs. III **II vs. IV *			II vs. IV *III vs. IV *
Nulliparous n = 6 (7%)	2.24 1.42/2.83	13.21 11.62/21.31	10.29 5.57/31.39	23.55 20.51/34.83
1 child n = 20 (25%)	2.53 2.02/2.93	17.41 9.53/36.63	13.06 6.33/23.02	27.81 24.20/32.97
2 children n = 39 (48%)	1.64 1.33/2.57	14.99 12.31/25.88	12.63 3.73/19.40	27.47 20.64/33.27
3 children n = 13 (16%)	1.78 1.35/2.35	13.70 11.47/33.47	12.38 3.78/23.60	24.44 18.29/27.37
4 children n = 1 (1%)	1.06	11.65	9.60	12.17
5 children n = 2 (2%)	1.96 1.36/2.55	15.82 8.05/23.59	10.46 4.00/16.92	21.54 14.58/28.49

Abbreviations: Significant p-values are highlighted: * <0.01, ** <0.001, *** p < 0.0001; TF—tissue factor; hsAdiponectin—high sensitive adiponectin.

Table 2. Baseline median and (IQR) serum levels of YKL-40, leptin, and adiponectin as well as citrate plasma TF activity stratified by Ki67, HER2 and hormone receptor expression.

Molecular Determinants/Number of Patients (%)	YKL-40 Concentration (ng/mL)	TF Activity (pM)	Leptin Concentration (ng/mL)	hsAdiponectin Concentration (ng/mL)
Expression of Ki67				*
<20%	1.86	13.79	12.36	28.19
n = 52 (64%)	1.31/2.57	10.82/25.20	4.11/18.69	22.94/33.11
≥20%	2.42	22.18	14.41	25.24
n = 29 (36%)	1.62/2.87	11.86/38.98	6.17/23.88	16.74/27.91
Expression of HER2				
Negative	1.91	14.99	12.61	27.12
n = 72 (89%)	1.42/2.84	11.55/29.18	4.81/20.71	20.64/32.22
Positive	2.44	12.46	8.77	26.99
n = 9 (11%)	1.44/2.56	11.59/15.20	3.67/16.92	19.18/27.91
Hormone receptor status				
ER+	2.02	14.55	12.55	27.09
n = 70 (86%)	1.42/2.87	11.47/26.92	4.92/20.64	20.64/32.31
ER-	1.64	14.18	13.83	27.05
n = 11 (14%)	1.58/2.43	11.86/31.56	3.78/22.47	14.70/28.13
PgR+	2.00	15.10	12.61	26.91
n = 66 (81%)	1.42/2.85	11.47/26.92	5.26/20.78	20.64/32.94
PgR-	1.78	13.70	7.79	27.13
n = 15 (19%)	1.58/2.83	11.77/31.56	3.67/18.26	16.74/28.13

Abbreviations: IQR—interquartile range, Ki67—proliferation marker, HER2—human epidermal growth factor receptor 2, ER—oestrogen receptor, PR—progesterone receptor, TF—tissue factor, hsAdiponectin—high sensitive adiponectin; significant p-values are highlighted: * <0.01.

3.2. Analysed Parameters According to Age, Menopausal Status, Parity Status, and Body Mass Index among BrC Cases

The age at diagnosis was categorised into two groups (<55/≥55 years) as well as menopausal status (premenopausal/postmenopausal). A lack of significant differences in the concentrations of YKL-40, leptin, and adiponectin as well as the TF activity with respect to age and menopausal status was noted. BMI (kg/m²) was classified as normal (18.5–24.9), overweight (25.0–29.9), and obesity class I and II (30.0–39.9) according to the WHO’s recommendations. Parity was defined as the number of full-term pregnancies. There was a trend towards a higher concentration of leptin and a lower concentration of adiponectin with increasing BMI in our study group. Interestingly, the concentrations of adiponectin and YKL-40 were dependent on parity status. A significantly higher concentration of YKL-40 was observed in BrC subjects who gave birth to one child than in cases who gave birth to two or three children. Patients who gave birth to one child or two children had a significantly higher concentration of adiponectin compared to subjects who gave birth to three children (Table 1).

3.3. Distribution of YKL-40, Leptin, and Adiponectin Concentrations and TF Activity According to Immunohistochemical Determinants in the Study Cohort

In Table 2, the statistical calculations for the study group are presented based on the proliferation marker (Ki67), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and the status of hormone receptors with respect to the analysed parameters. The patients were divided into two groups on the basis of the proliferation marker, expressed by the Ki67 protein. The first group was made up of women with expression of the Ki67 antigen lower than 20%, and the second group included patients with Ki67 expression above 20%. A markedly higher concentration of adiponectin was observed in patients with expression of Ki67 lower than 20% (p < 0.01). Other molecular determinants did not differ significantly with regard to YKL-40, leptin, adiponectin, and TF activity.

Table 3. The biomarker concentrations with respect to clinical and pathological characteristics in breast cancer (BrC) subjects.

Feature/Number of Patients (%)	YKL-40 Concentration (ng/mL)	TF Activity (pM)	Leptin Concentration (ng/mL)	hsAdiponectin Concentration (ng/mL)
Molecular subtypes		*		I vs. IV *
Luminal A n = 50 (62%)	1.91 1.33/2.92	13.92 10.61/25.20	12.61 5.57/20.64	28.88 22.62/33.63
Luminal B HER2- n = 13 (16%)	2.81 1.83/2.85	36.18 19.62/39.18	12.38 4.00/19.21	25.24 20.51/27.71
Luminal B HER2+ and Non-Luminal HER2+ n = 9 (11%)	2.44 1.44/2.56	12.46 11.59/15.20	8.77 3.67/16.92	26.99 19.18/27.91
Basal-like n = 9 (11%)	1.62 1.58/1.78	14.18 11.86/31.56	13.83 3.78/22.47	24.44 14.70/27.47
Tumour diameter				
T1 (2 cm) n = 55 (68%)	1.87 1.42/2.92	14.99 11.62/25.88	12.38 4.43/22.47	27.13 20.64/32.31
T2 (≥2 cm <5 cm) n = 26 (32%)	2.14 1.50/2.81	14.03 10.42/29.59	13.57 4.92/18.26	26.22 18.79/32.1
Nodal status				
LN- n = 62 (77%)	2.16 1.52/2.92	16.29 11.17/25.88	12.30 4.7/22.47	27.02 20.51/32.13
LN+ n = 19 (23%)	1.58 1.29/2.48	13.88 11.77/29.88	13.83 4.60/18.26	27.18 23.34/31.14
Stage of disease				
IA n = 40 (49%)	2.19 1.48/3.04	18.28 11.53/25.72	12.30 4.85/26.21	27.06 20.36/31.95
IIA + IIB n = 41 (51%)	1.89 1.36/2.51	13.88 11.62/29.59	12.63 4.70/17.89	27.05 23.34/32.10
Elston and Ellis grade				
G1 + G2 n = 65 (80%)	2.03 1.43/2.92	14.06 11.47/25.88	12.51 4.92/20.64	26.83 20.64/32.13
G3 n = 16 (20%)	1.63 1.39/2.43	15.10 12.31/37.58	14.35 4.57/20.37	27.59 17.61/29.70
Histological type	*		*	**
Ductal n = 69 (85%)	2.03 1.58/2.90	14.99 11.47/28.76	13.53 5.34/22.47	26.23 19.76/30.30
Lobular n = 12 (15%)	1.38 1.17/2.09	13.64 12.06/24.12	5.00 2.81/13.18	32.70 28.83/34.41

Abbreviations: LN—free of lymph node involvement, LN+—lymph node involvement, TF—tissue factor, hsAdiponectin—high sensitive adiponectin; significant p-values are highlighted: * <0.01; ** <0.001.

3.4. Distribution of YKL-40, TF Activity, Leptin, and Adiponectin According to Clinicopathological Characteristics in the Study Group

Furthermore, we hypothesised that the concentrations of YKL-40, leptin, and adiponectin and TF activity can vary according to the molecular subtype, tumour diameter, nodal status, staging, grading indexing, and histological subtypes of BrC. A significantly higher concentration of adiponectin in the luminal A-type of BrC compared to patients having a basal-like type was noted ($p < 0.01$). Additionally, a significantly higher TF activity was observed in the luminal B HER2-negative type of BrC with respect to patients having other molecular subtypes, including luminal A, luminal B HER(+), and HER(+)/non-luminal, basal-like BrC ($p < 0.01$). Interestingly, we observed significantly higher concentrations of YKL-40 and leptin (both $p < 0.01$), but a lower concentration of adiponectin ($p < 0.001$) in the group of patients with invasive ductal carcinoma with respect to their invasive lobular carcinoma counterparts. Furthermore, circulating YKL-40, leptin, and adiponectin concentrations and TF activity

have not been associated with other prognostic indicators, such as tumour grade and TNM stage or tumour size and nodal status (Table 3).

3.5. Predictive Factors for Invasive BrC in Multivariate Cox Proportional Hazards Regression Analysis

The multivariate Cox hazards analysis, which takes into account the function of time, revealed that the activity of tissue factor (HR, 1.07; 95% confidence interval (CI), 1.01–1.14; $p = 0.0240$), leptin concentration (HR, 1.21; 95% CI, 1.02–1.44; $p = 0.0327$), BMI (HR, 0.75; 95% CI, 0.59–0.95; $p = 0.0178$), and adiponectin level (HR, 0.86; 95% CI, 0.76–0.97; $p = 0.0135$) were significant predictive factors for disease relapse in BrC subjects. The multivariate Cox regression showed that BrC subjects with lower BMI values and adiponectin levels but with higher TF activity and leptin concentrations have a significantly higher risk of recurrent events (Table 4).

Table 4. The multivariate Cox HRs for PFS according to the baseline serum values of BMI, TF activity, YKL-40, leptin, and adiponectin.

Variables	HR	95% CI		<i>p</i> -Value
BMI	0.75	0.59	0.95	0.0178
TF activity	1.07	1.01	1.14	0.0240
YKL-40	0.82	0.51	1.35	0.4434
Leptin	1.21	1.02	1.44	0.0327
hsAdiponectin	0.86	0.76	0.97	0.0135

Abbreviations: HR—hazard ratio, PFS—progression free survival, CI—confidence interval, BMI—body mass index, TF—tissue factor, hsAdiponectin—high sensitive adiponectin; significant *p*-values are in bold.

3.6. Assessment of the Analysed Parameters’ Ability to Predict Disease Recurrence; Analysis by the Receiver Operating Characteristics Curve (ROC)

Additionally, we performed receiver operating characteristic (ROC) curve analysis according to logistic regression to describe the ability of the five biomarkers including BMI and TF activity and the concentrations of YKL-40, leptin, and adiponectin to predict disease relapse (Figure 1). The estimated area under the ROC curve for the tested model was AUC = 0.84, with 95% CI = 0.823 to 0.931, $R^2 = 0.7515$, and p value = 0.0075. This model points to strong diagnostic potential for the prediction of disease progression.

3.7. Survival Predictive Value of Pre-Treatment YKL-40 Concentration (A), TF Activity (B), and BMI (C)

We analysed the association between the pre-treatment concentrations of YKL-40, leptin, and adiponectin and TF activity as well as body mass index and disease relapse based on the 44 month follow-up of those patients (Figure 2). The data show that, during the follow-up period of more than four years, 11 of the 81 BrC patients (13.58%) had a relapse of disease. Five (6.17%) patients died during the follow-up period due to systemic metastatic disease (bones, liver, and spine metastases). Figure 2A demonstrates the division of the study group according to YKL-40 concentration. In the low YKL-40 subgroup, recurrent events occurred in two subjects out of the total of 27 followed-up subjects (7.41%). In the moderate YKL-40 subgroup, recurrent events happened in three patients out of the total of 27 followed-up subjects (11.11%). Finally, in the high YKL-40 subgroup, recurrent events occurred in six cases out of the total of 27 followed-up subjects (22.22%). Thus, patients with YKL-40 higher than 2.5 ng/mL demonstrated a significantly higher risk of disease recurrence compared to patients with a YKL-40 concentration lower than 1.6 ng/mL ($p = 0.0464$). Patients with TF activity lower than 12 pM ($n = 26$) had a significantly lower risk of disease progression (3.85%) with respect to those patients with TF activity higher than 24 pM (21.43%; $n = 28$); $p = 0.0142$ (Figure 2B). Furthermore, the study group was divided into three subgroups according to BMI values. There was a significantly higher incidence of disease relapse in BrC patients with a BMI ($n = 38$) lower than 24.9 kg/m² compared to those with a BMI of 25–29.9 kg/m² ($n = 28$; $p = 0.0444$). The recurrence rate for normal-weight BrC

cases was 21.05% versus 7.14% for overweight cases. Thus, a BMI lower than 25 kg/m² was associated with a three-fold higher risk of disease relapse (Figure 2C). In those eight normal-weight recurrent cases (the mean value of BMI was 22.4 kg/m²), three of them had luminal A, three had luminal B HER-, and two had a basal-like intrinsic subtype of BrC. Four patients were premenopausal, and four of them were postmenopausal. All of the patients were symptomatically free of other co-morbidities. All of them had moderately differentiated carcinomas (G2). Two out of eight had a positive lymph-node status. Four out of eight had overexpression of the proliferation marker Ki67. Five out of eight had a tumour larger than 2 cm. Five out of eight underwent breast-conserving surgery due to a lack of lymph node metastases. Additionally, five out of eight received radiotherapy, chemotherapy, or hormone therapy. According to additional analysis in those eight normal-weight recurrent women, the highest level of YKL-40 and TF activity but the lowest adiponectin level were observed (Table 5). Due to the limited space in the manuscript, we do not show separate plots for leptin and adiponectin, since neither demonstrated significant associations with disease recurrence.

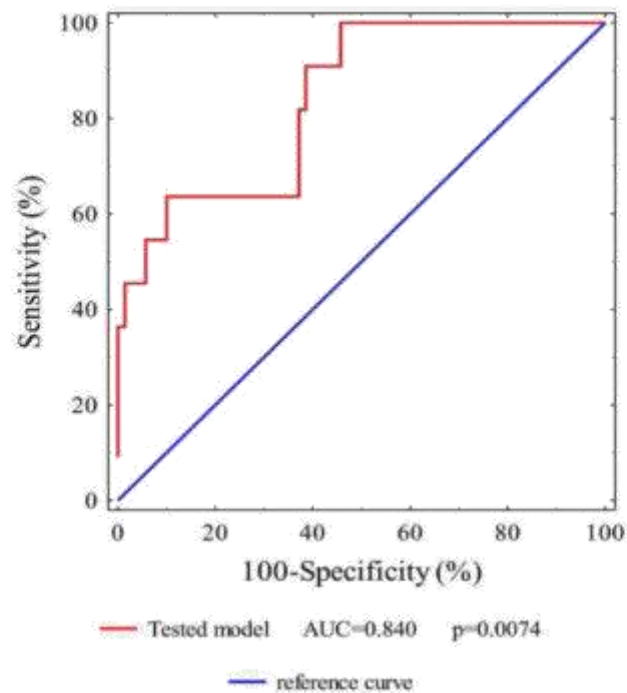


Figure 1. Receiver operating characteristic (ROC) curve for the tested model in patients with versus without disease progression. The area under the curve (AUC) and the *p* value are indicated.

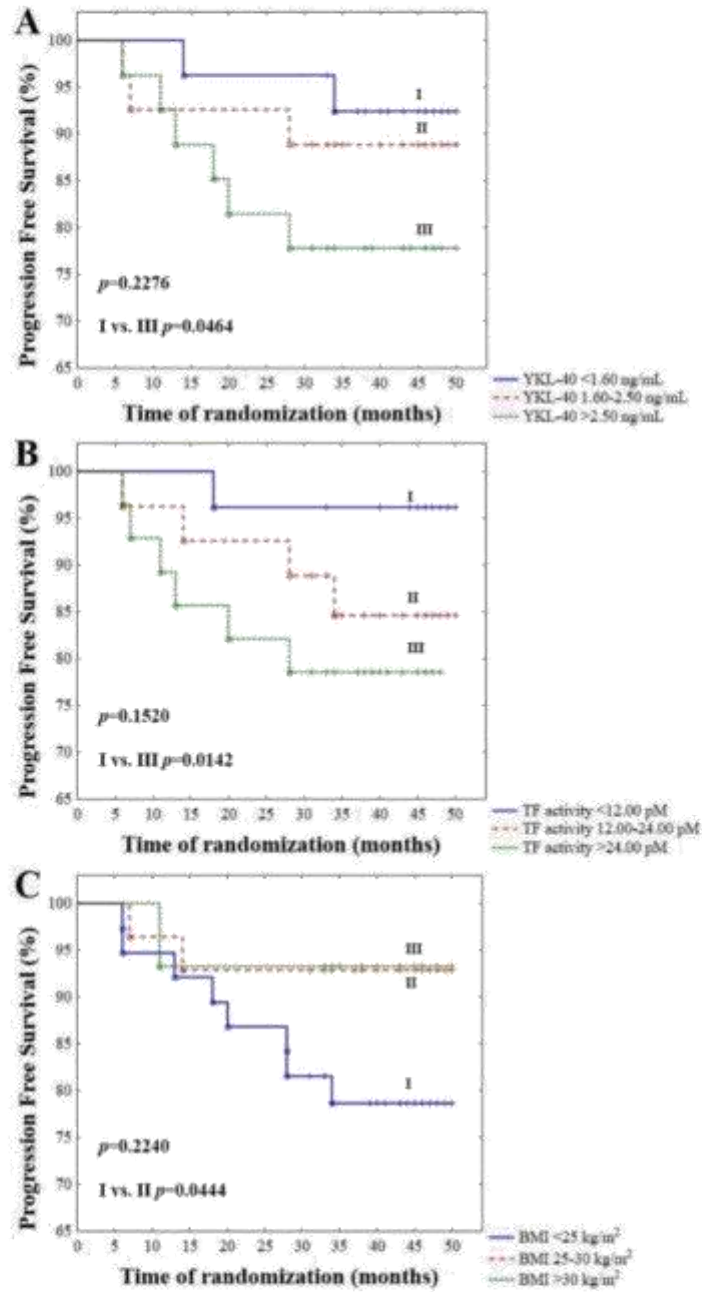


Figure 2. Kaplan–Meier survival curves showing baseline serum YKL-40 (A), TF activity (B), and BMI (C), divided according to cut-offs for YKL-40: < 1.6 ng/mL, 1.6–2.5 ng/mL, and >2.5 ng/mL; TF activity: <12 pM, 12–24 pM, and >24 pM; and BMI value: <24.9 kg/m², 25–29.9 kg/m², and >30 kg/m², respectively.

Table 5. Distribution of YKL-40, TF activity, leptin, and adiponectin in recurrent patients.

Variables/Number of Patients (%)	YKL-40 Concentration (ng/mL)	TF Activity (pM)	Leptin Concentration (ng/mL)	hsAdiponectin Concentration (ng/mL)
Progression	2.69	24.09	5.41	21.59
18.5–24.9 kg/m ² n = 8 (10%)	1.82/3.46	13.85/40.49	3.77/15.67	17.61/29.88

Abbreviations: TF—tissue factor, hsAdiponectin—high sensitive adiponectin.

3.8. Survival Time Analysis with Respect to the Combination of YKL-40 Concentration with TF Activity (3A), the BMI Value with TF Activity (3B), the BMI Value with YKL-40 Level (3C), the BMI Value with Leptin Level (4A), and the BMI Value with Adiponectin Level (4B)

A combination of YKL-40 concentration with TF activity in BrC cases revealed an interesting observation. A worse future prognosis was shown in subjects with a combination of a YKL-40 concentration higher than 1.93 mg/mL and a TF activity higher than 14.18 pM (Figure 3A). Figures 3C and 4A demonstrate a significantly better BrC specific survival for overweight/obese subjects with higher YKL-40 (>1.93 ng/mL) and higher leptin (>12.58 ng/mL) levels with respect to normal-weight cases with YKL-40 higher than 1.93 ng/mL and leptin higher than 12.58 ng/mL ($p = 0.0065$ and $p = 0.0459$, respectively). The recurrence of the disease in the group of overweight/obese patients with higher YKL-40 (>1.93 ng/mL) occurred in one out of 22 (4.55%) cases, but in the subgroup with normal weight and higher YKL-40 levels (>1.93 ng/mL), six out of 19 (31.58%) cases had a recurrence of the disease. The recurrence of the disease in the group of overweight/obese patients with a leptin concentration higher than 12.58 ng/mL occurred in three out of 33 (9.09%), but in the subgroup with normal weight and leptin levels higher than 12.58 ng/mL, three out of eight (37.5%) cases had a recurrence of the disease. Furthermore, follow-up revealed a significantly higher incidence of disease relapse in breast cancer patients with a BMI lower than 25 kg/m² and an adiponectin level lower than 27.05 ng/mL with respect to those with a BMI higher than 25 kg/m² and an adiponectin level lower than 27.05 ng/mL ($p = 0.0069$) (Figure 4B). The recurrence of the disease in the group of patients with a BMI lower than 25 kg/m² and an adiponectin level lower than 27.05 ng/mL occurred in five out of 16 (31.25%), but in the group with a BMI higher than 25 kg/m² and an adiponectin level lower than 27.05 ng/mL, only one out of 24 (4.17%) cases had a recurrence of the disease.

3.9. Survival Time Analysis with Respect to Parity Status

According to our invasive breast cancer cohort, we demonstrated that parity status may predict disease recurrence ($p = 0.0317$). Interestingly, nulliparous women (33.3%) as well as women who gave birth to five children (100%) had the worst future prognosis (Figure 5). Both nulliparous women were postmenopausal subjects, free of other co-morbidities, with BMI = 24 kg/m² and 22.41 kg/m², and age = 55 and 60 years, respectively. The first patient had the following clinicopathological profile: IIA, T2, N0, M0, invasive ductal carcinoma, histological grade = 2, tumour diameter = 2.2 cm, ER+/PR- and HER2-, Ki-67 = 20%, and luminal B HER2 (-). The baseline values were YKL-40 = 1.99 ng/mL, leptin = 34.1 ng/mL, adiponectin = 20.51 ng/mL, and TF activity = 14.10 pM. The patient, after 28 months of follow-up, developed right ovary metastasis. The second patient presented the following clinicopathological profile: IIB, T2, N1, M0, invasive ductal carcinoma, histological grade = 2, tumour diameter = 2.8 cm, ER+/PR+ and HER2-, Ki-67 = 80%, and luminal B HER2 (-). The pre-treatment values were YKL-40 = 2.83 ng/mL, leptin = 14.41 ng/mL, adiponectin = 34.83 ng/mL, and TF activity = 39.16 pM. After 13 months of follow-up, multi-organ metastases were confirmed by PET. Both multiparous women (five children) were premenopausal subjects, free of other co-morbidities with BMI = 21.97 kg/m² and 24.24 kg/m², and age = 49 and 53 years, respectively. The first patient demonstrated the following clinicopathological profile: IIA, T2, N0, M0, invasive ductal carcinoma, histological grade = 2, tumour diameter = 2.5 cm, ER+/PR+ and HER2-, Ki-67 = 40%, and luminal B HER2 (-). The baseline values were YKL-40 = 1.36 ng/mL, leptin = 4.1 ng/mL, adiponectin = 14.58 ng/mL, and TF activity = 23.59 pM. The patient, after 34 months of follow-up,

developed bone, mediastinal, and supraclavicular lymph-node metastases confirmed by PET. The second patient showed the following clinicopathological profile: IIB, T2, N1, M0, invasive ductal carcinoma, histological grade = 2, tumour diameter = 3.0 cm, ER+/PR+ and HER2-, Ki-67 = 15%, and luminal A. The pre-treatment values were YKL-40 = 2.55 ng/mL, leptin = 16.92 ng/mL, adiponectin = 28.49 ng/mL, and TF activity = 8.05 pM. However, this patient passed away due to lung, liver, and bone metastases within 18 months of diagnosis.

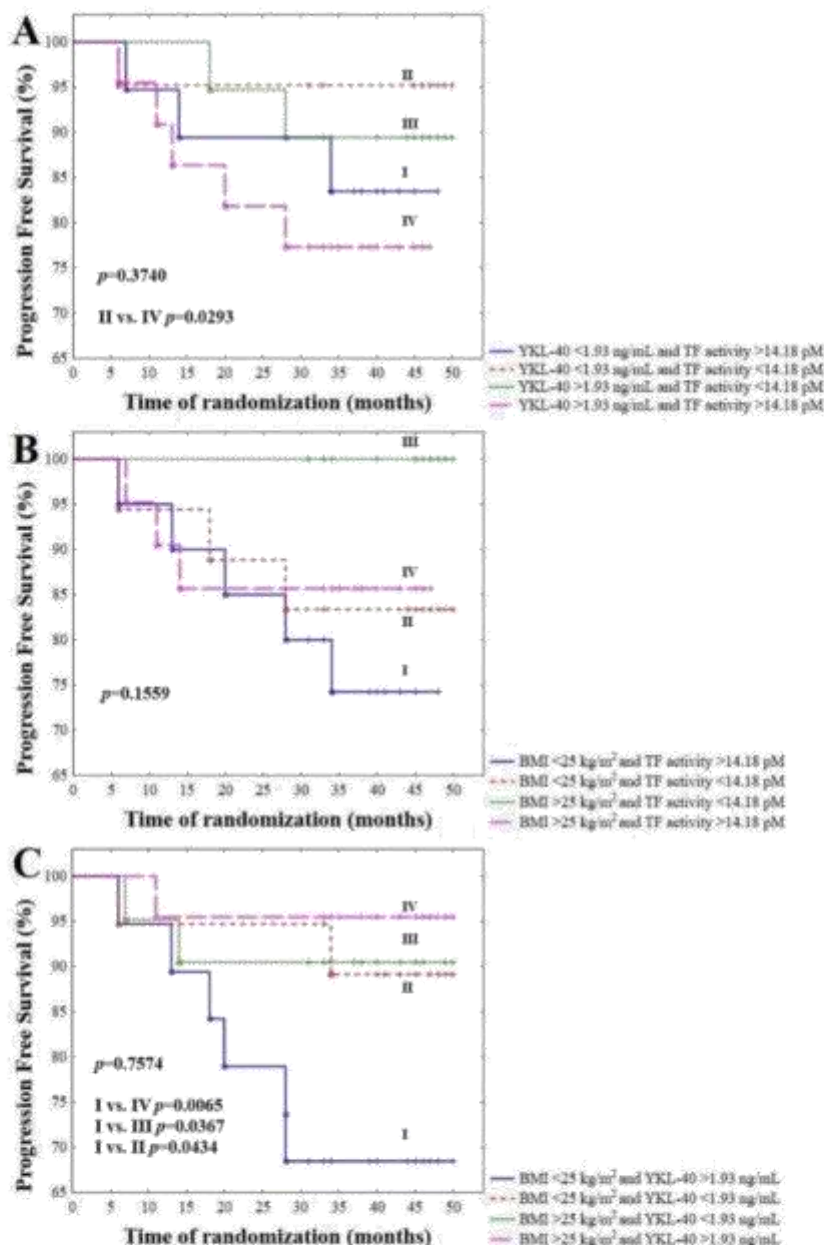


Figure 3. Combination of the YKL-40 level with TF activity (A), the value of BMI with YKL-40 (B), and BMI with TF activity (C), in disease relapse prediction.

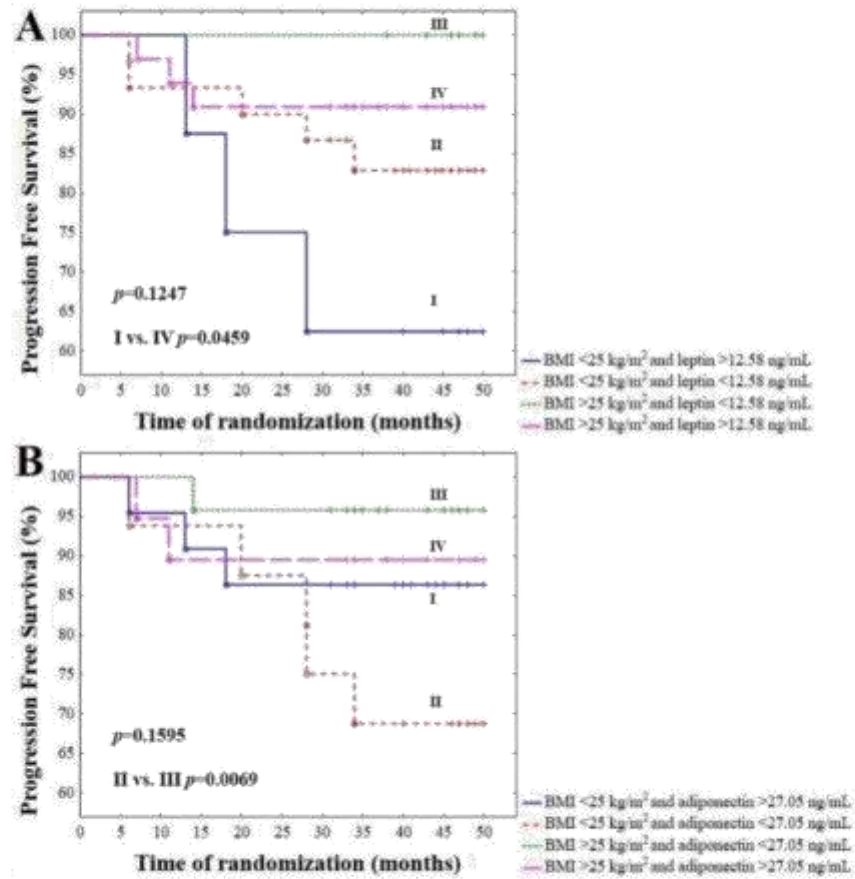


Figure 4. Combination of BMI with the leptin concentration (A) and the combination of BMI with the adiponectin concentration (B) with respect to disease relapse prediction.

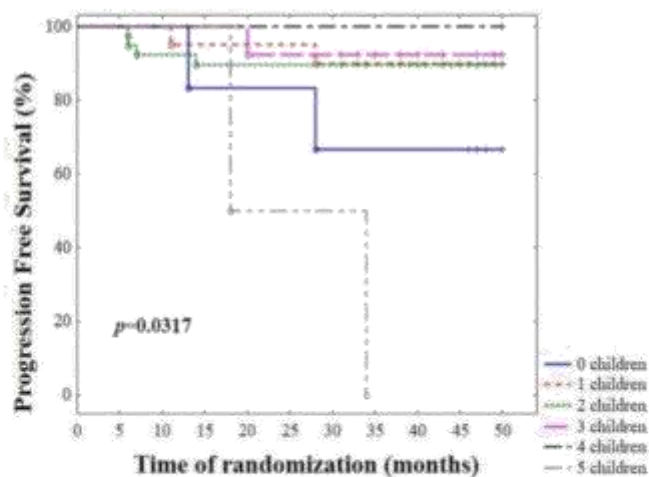


Figure 5. Kaplan–Meier survival analysis according to parity status.

4. Discussion

BrC is a complex neoplastic disease, comprising the processes of unsuppressed proliferation, the elusion of growth suppressors, abnormalities in cell death, the promotion of a pro-angiogenic phenotype, the initiation of invasion and metastasis, the disruption of cellular homeostasis, and the avoidance of immune destruction with the additional significant possibility of relapse [11,20]. Thus, the complex heterogeneity of breast cancer at the molecular level forces a search for prognostic biomarkers, which can be simply estimated or implemented.

4.1. Baseline Values of YKL-40, Leptin, Adiponectin, and TF Activity with Respect to Demographic, Anthropometric, and Clinicopathological Features

Adipokines and coagulation factors as well as pro-inflammatory cytokines, have been proposed as a link between obesity and oncogenesis and are related to future prognosis. Our analyses showed a significantly higher concentration of leptin as well as a lower concentration of adiponectin with increasing BMI in breast cancer subjects. This configuration of circulating adipokines is widely accepted in the literature, since body composition changes with age, especially the amount of body fat, which leads to the attenuation of energy homeostasis and variation in adipose tissue metabolism [2,3,11,21,22]. Leptin and adiponectin in cancer biology work in an inverse manner, since leptin plays a crucial role in the promotion of tumour angiogenesis, cell invasion, and metastasis, whereas adiponectin possesses anti-tumour properties, including anti-proliferative, anti-migratory, and pro-apoptotic actions [2,3,21]. Our findings are in line with previous studies, which demonstrated that leptin positively correlates with breast cancer risk, while a low adiponectin concentration is linked to a higher risk of breast cancer [23]. The overexpression of leptin and down-regulation of adiponectin are most commonly associated with progressing or poor prognosis tumours [21,24].

Interestingly, in our study, we observed that the concentration of YKL-40 and adiponectin levels vary with respect to parity. A significant higher concentration of YKL-40 was observed in breast cancer subjects who gave birth to one child than in those cases who gave birth to two or three children. Patients who gave birth to one child or two children had a significantly higher concentration of adiponectin compared to subjects who gave birth to three children. Due to the fact that adiponectin is recognised as an anti-cancer protein, its higher concentration seems to have a protective effect in those patients [3,10]. However, a higher concentration of YKL-40 in those cases can attenuate this positive effect, since YKL-40 is a pro-cancerogenic, pro-angiogenic, pro-inflammatory protein [14–18]. Furthermore, nulliparous as well as multiparous (five children) BrC subjects had the worst future prognosis. According to our results, we speculate that nulliparous and multiparous BrC patients developed a more aggressive phenotype of breast cancer, expressed by a larger tumour size, a higher stage, and a higher expression of the mitotic index. Interestingly, all of those patients had a BMI in the normal range and three out of four had a concentration of YKL-40 higher than 1.93 ng/mL. Three of those four patients demonstrated the luminal B HER2-negative type of BrC.

The present study also shows that the adiponectin level is higher in breast cancer cases with a lower mitotic index, expressed by Ki67, compared to cancers with overexpression of Ki67. Ki67 is a proliferation marker in clinical practice as a marker of tumour aggressiveness and a predictor of future outcomes. Additionally, a higher adiponectin level was observed in luminal A breast cancer cases than in their basal-like counterparts. The luminal A breast cancer type is defined as hormone receptor-positive and HER2-negative with an expression of Ki67 lower than 20%. Thus, our study confirmed previous findings that the adiponectin concentration depends on the oestrogen receptor status [25,26]. Those observations indicate an inverse association between the adiponectin concentration and an aggressive phenotype, and the adiponectin level depends more on the molecular status than clinical features, including tumour diameter or lymph-node status. It is well-known that luminal A breast cancer presents a better prognosis than other intrinsic subtypes. Adiponectin diminishes proliferation, stimulates apoptosis, and negatively influences breast carcinogenesis and the ability for invasion and metastasis [27]. This result may also confirm that luminal A breast cancer

with low expression of Ki67 presents the possibility of a more favourable outcome for patients in light of the anti-neoplastic properties of adiponectin. However, the findings of Ando et al. and Panno et al. demonstrated that adiponectin in ER-negative BrC cells diminishes cell growth and suppresses proliferation, invasion, and cancer cell motility [25], but divergent effects of adiponectin were noted with respect to luminal-like BrC cells [26]. A scientific consensus with respect to adiponectin's role in neoplastic diseases is needed; thus, we would recommend analysis of adiponectin levels in the context of hormone receptor status in subsequent studies. Furthermore, significantly higher TF activity was observed in the luminal B HER2-negative type of breast cancer with respect to patients having other molecular subtypes. The overexpression of TF is associated with an invasive character of tumours and may be particularly related to cancer-associated thrombosis. Moreover, TF stimulates an *angiogenic switch*, leading to new vessel formation and further cancer cell growth [28]. Thus, elevated TF activity is associated with decreased overall survival [28,29]. TF activity and adiponectin levels are sensitive to the tumour's molecular status and may serve as single biomarkers for future prognosis.

Interestingly, we observed significantly higher concentrations of YKL-40 and leptin but a lower concentration of adiponectin in the group of patients with invasive ductal carcinoma with respect to their invasive lobular carcinoma counterparts. This constellation of cytokines seems to be unfavourable for those patients due to the role of leptin in the production of anti-apoptotic agents, pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6), growth factors (VEGF), and the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), promoting the cancerous behaviour of cells [23]. Additionally, leptin has been shown to be a potential prognostic marker in breast cancer, along with tumour size and lymph-node status, and an independent predictor of a poor outcome [22]. Additionally, YKL-40 is a key pro-inflammatory cytokine associated with the pathology of obesity-linked cancers. A high YKL-40 serum concentration was significantly associated with invasive lobular carcinoma, TMN stage III, lymph-node metastases, and death [17]. However, a low adiponectin concentration is associated with a more aggressive BrC character [2,10].

4.2. YKL-40 Level and TF Activity as Predictors of Disease Recurrence

Our analysis indicates that the pre-treatment concentration of YKL-40 and TF activity are suitable prognostic biomarkers of progression-free survival (PFS) with respect to considering them as a single parameter as well as combining them. We reported the main significant effects of circulating TF and YKL-40 in predicting disease relapse, indicating that an elevated YKL-40 level and TF activity demonstrate negative prognostic value. Furthermore, a worse future prognosis was shown for subjects with a combination of a higher YKL-40 concentration (>1.93 mg/mL) with higher TF activity (above 14.18 pM), since both components exert pro-tumorigenic properties. The cut-off values were established according to the median values for the whole study population. As YKL-40 is an inflammation-related molecule, its elevated level was positively associated with poor disease-free survival [14,18]. Likewise, YKL-40 controls key pathways and processes within the tumour microenvironment, including inflammation, angiogenesis, cell proliferation, differentiation, and the remodelling of the extracellular matrix and thus promotes tumour progression [15]. Interestingly, Roslind et al. claimed that serum concentrations of YKL-40 may provide a more consistent biomarker of a specific patient's disease progression as intratumoral YKL-40 expression can vary across a single breast cancer nodule [16]. Interestingly, TF can also be secreted under pro-inflammatory conditions in a soluble form. TF can be hyperexpressed in response to TNF- α and IL-1 β release [21]. Perhaps YKL-40 also stimulates TF shedding, since it is a pro-inflammatory protein. These outcomes support the concept that the inflammatory response is a complex systemic reaction and is associated with a poor outcome in patients with invasive BrC.

4.3. BMI's Value as a Predictor of Disease Recurrence

Undoubtedly, an excess amount of body adipose tissue is a risk factor for breast cancer development and is associated with higher cancer mortality [3]. Surprisingly, in our study, we reported that adiposity

positively influences overall survival. Similar to the results for the Kaplan–Meier plots, the Cox’s analysis showed that a low BMI (normal weight) was a predictive factor for a shorter time to disease recurrence in BrC subjects. Undeniably, this clinicopathological characteristic is crucial in disease prognosis; however, our normal-weight cohort were not affected substantially (Figure 2C). We found that patients with a BMI > 25 kg/m² had a three-fold lower risk for recurrence than patients with a BMI < 25 kg/m². Pajares et al. showed that obesity (BMI 30.0 to 34.9 kg/m²) is not associated with worse survival outcomes in operable BrC patients; only severely obese patients (BMI ≥ 35.0) had an increased risk of recurrence [6]. Additionally, Widschwendter et al. noted that severely obese subjects demonstrated significantly worse overall survival than underweight or normal-weight cases [5]. However, Playdon et al. noted that for each 5 kg/m² rise in BMI, there was an approximately 18% increase in the risk of total breast cancer mortality [23]. Since the data are inconsistent, further evaluations are still required.

4.4. Combination of BMI Values with YKL-40 Level and BMI with Leptin and Adiponectin as Predictors of Disease Recurrence

Furthermore, our study has shown increased rates of recurrence, as well as cancer-specific mortality, in the cases with a normal BMI and a lower concentration of adiponectin as well as those with a normal BMI and a higher concentration of leptin and YKL-40, independently of other prognostic covariates. Interestingly, in our study, leptin and adiponectin did not demonstrate predictive value as single biomarkers. Thus, a normal BMI is not equivalent to proper body composition. We speculate that it can be associated with subclinical insulin resistance and hyperinsulinemia independent of adiposity, since an altered adipokine profile (high level of leptin and low level of adiponectin) leads to metabolic derangements. It follows that patients with a low adiponectin concentration develop a biologically more aggressive BrC phenotype independently of hormone receptor status [2,10], since a low serum adiponectin level is associated with elevated levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and insulin-like growth factor (IGF) [30]. Moreover, adiponectin exerts efficient tumour growth-limiting influence by the inhibition of the inflammasomes in breast cancer cells [10]. Adiponectin is also considered an anti-inflammatory cytokine due to its ability to inhibit nuclear factor κB (NF-κB) phosphorylation and exhibits anti-migratory activity by inhibiting the Wnt/β-catenin signalling pathway, fundamental for cancer progression [2]. However, elevated leptin levels are associated with breast cancer aggressiveness and a bad prognosis. Leptin is believed to be involved in the growth and invasion of breast cancer cells by stimulating the conversion of aromatisable androgens (androstenedione and dehydroepiandrosterone) to oestradiol [4,11]. Therefore, the diminution of adiponectin (an anti-inflammatory adipokine) and exacerbation of leptin and YKL-40 (pro-inflammatory cytokines) in normal-weight breast cancer subjects may be associated with a more aggressive tumour phenotype. Additional research is needed to further determine the exact relationship between our observed interaction and the modulation of adipokines in breast cancer.

From our study, we suggest that pre-treatment obesity itself is not the cause of cancer-associated sequelae, but the adiposity-related metabolic abnormalities include pro-inflammatory macrophage polarisation, insulin resistance, and disproportionate adipokine secretion by adipose tissue. We herein propose a tentative division of patients into metabolically healthy obese subjects and metabolically unhealthy lean individuals. It suggests a substantial heterogeneity of metabolic features in normal-weight breast cancer females. Our findings potentially reject the hypothesis that adiposity is an independent prognostic factor for developing distant metastases and death as a result of breast cancer. Apparently, obesity is a risk factor for hormone-sensitive cancer development, but it improves future outcomes. It is likely we observed a kind of “obesity paradox phenomenon” in those cases. There are data demonstrating that a moderately increased BMI ameliorates survival and the response to therapy [31]. Sánchez-Jiménez et al. suggest that increased fat mass may provide an energy depot that may be beneficial for a longer survival rate [11]. Murphy W.J. and Longo D.L. have noted a positive impact of adiposity on a better response to immunotherapy in different types of cancer [32].

According to the multivariate Cox proportional risk model and the excellent area under the ROC curve for the tested model, we have demonstrated the usefulness of applying pre-treatment YKL-40, BMI, leptin, and adiponectin levels and TF activity together as biomarkers for predicting disease relapse. Thus, our results suggest that a non-obese phenotype with high leptin and YKL-40 and low adiponectin levels in breast cancer leads to cancer cell migration and invasion to promote metastasis and reduced survival. Using the biomarkers proposed here would provide more information about future prognosis and survival rates. Leptin has been identified as a key driver in the progression of breast cancer [27]. Adiponectin was originally defined as a tumour suppressor protein by promoting the inhibition of cell proliferation and sensitisation of cells to apoptosis [27]. YKL-40 is a protein that stimulates cancer cell dissemination and progression. Adipokines could be useful diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers, reflecting advanced-stage BrC, adverse prognosis, and an inflammatory state.

The strength of this study is that it is based on an early-stage breast cancer cohort with complete information on clinicopathological characteristics and more than four years of follow-up. In addition, the prospective design contributed to a reduction in potential biases. The major limitations of this study include the small sample size and the lack of information related to waist circumference (WC) and waist-to-hip ratio (WHR). The BMI was evaluated only at the beginning of follow-up, and further fluctuations were not examined. Additionally, the analyses in this study were conducted using a single measurement of the YKL-40, adipokines, and TF activity from one pre-treatment blood sample. The patients were recruited from a single institution, predisposing to selection and referral bias and potentially limiting the generalisability to larger populations. We excluded patients with Stage IIIA or higher and metastatic BrC tumours; perhaps this action limited the ability to assess the analysed parameters in more advanced tumours. Finally, since we only studied individuals of Polish descent, our results are, therefore, not necessarily directly applicable to other ethnic groups.

5. Conclusions

Our study concluded that a combination of high baseline serum levels of YKL-40 and leptin with a normal BMI as well as of a normal BMI with a lower adiponectin level confer a poor prognosis. Additionally, a single higher YKL-40 concentration and single elevated TF activity were significantly associated with poorer prognosis of breast cancer over the four-year follow-up. According to our results, we suggest that overweight breast cancer patients have a better prognosis regardless of the YKL-40, leptin, and adiponectin levels since we estimated an approximately three-fold increased risk of disease recurrence or death for normal-weight versus obese women. Further investigations that elucidate the mechanisms concerning adipose tissue derivatives, including adipokines and cytokines, may help to understand and prevent severe outcomes in normal-weight-related breast cancer.

Author Contributions: Conceptualization, K.B., B.R.-C., P.R.; Data curation, B.R.-C., P.R.; Formal analysis, K.B.; Funding acquisition, K.B., P.R., M.B.; Investigation, K.B., B.R.-C.; Methodology, K.B., B.R.-C.; Project administration, B.R.-C., M.B.; Resources, K.B., P.R., M.B.; Supervision, B.R.-C.; Software, K.B.; Validation, K.B., B.R.-C.; Writing—Original draft, K.B., B.R.-C.; writing—Review & editing, B.R.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Acknowledgments: We would like to thank all of the patients for participating in our study. Many thanks to the biomedical laboratory scientists Barbara Góralczyk, Małgorzata Michalska for their contribution in samples preparation and laboratory assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Demark-Wahnefried, W.; Campbell, K.L.; Hayes, S.C. Weight management and its role in breast cancer rehabilitation. *Cancer* **2012**, *118* (Suppl. S8), 2277–2287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Gelsomino, L.; Naimo, G.D.; Catalano, S.; Mauro, L.; Andò, S. The emerging role of adiponectin in female malignancies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2127. [CrossRef] [PubMed]
3. Picon-Ruiz, M.; Morata-Tarifa, C.; Valle-Goffin, J.J.; Friedman, E.R.; Slingerland, J.M. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 378–397. [CrossRef] [PubMed]
4. Ray, A. Cancer and comorbidity: The role of leptin in breast cancer and associated pathologies. *World J. Clin. Cases* **2018**, *6*, 483–492. [CrossRef] [PubMed]
5. Widschwendter, P.; Friedl, T.W.; Schwentner, L.; DeGregorio, N.; Jaeger, B.; Schramm, A.; Bekes, I.; Deniz, M.; Lato, K.; Weissenbacher, T.; et al. The influence of obesity on survival in early, high-risk breast cancer: Results from the randomized SUCCESS A trial. *Breast Cancer Res.* **2015**, *17*, 129. [CrossRef] [PubMed]
6. Pajares, B.; Pollán, M.; Martín, M.; Mackey, J.R.; Lluch, A.; Gavila, J.; Vogel, C.; Ruiz-Borrego, M.; Calvo, L.; Pienkowski, T.; et al. Obesity and survival in operable breast cancer patients treated with adjuvant anthracyclines and taxanes according to pathological subtypes: A pooled analysis. *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, R105. [CrossRef]
7. Rubio-Jurado, B.; Balderas-Peña, L.M.; García-Luna, E.E.; Zavala-Cerna, M.G.; Riebeling-Navarro, C.; Reyes, P.A.; Nava-Zavala, A.H. Obesity, thrombotic risk, and inflammation in cancer. *Adv. Clin. Chem.* **2018**, *85*, 71–89.
8. Chen, L.; Kong, X.; Wang, Z.; Wang, X.; Fang, Y.; Wang, J. Pre-treatment systemic immune-inflammation index is a useful prognostic indicator in patients with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *J. Cell Mol. Med.* **2020**, *24*, 2993–3021. [CrossRef]
9. Breast Cancer: Statistics. Available online: <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/statistics> (accessed on 6 April 2020).
10. Pham, D.V.; Raut, P.K.; Pandit, M.; Chang, J.H.; Katila, N.; Choi, D.Y.; Jeong, J.H.; Park, P.H. Globular adiponectin inhibits breast cancer cell growth through modulation of inflammasome activation: Critical role of Sestrin2 and AMPK signaling. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 613. [CrossRef]
11. Sánchez-Jiménez, F.; Pérez-Pérez, A.; de la Cruz-Merino, L.; Sánchez-Margalet, V. Obesity and breast cancer: Role of leptin. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 596. [CrossRef]
12. Gong, T.T.; Wu, Q.J.; Wang, Y.L.; Ma, X.X. Circulating adiponectin, leptin and adiponectin-leptin ratio and endometrial cancer risk: Evidence from a meta-analysis of epidemiologic studies. *Int. J. Cancer* **2015**, *137*, 1967–1978. [CrossRef] [PubMed]
13. Graf, C.; Ruf, W. Tissue factor as a mediator of coagulation and signaling in cancer and chronic inflammation. *Thromb. Res.* **2018**, *164*, 143–147. [CrossRef] [PubMed]
14. Kjaergaard, A.D.; Nordestgaard, B.G.; Johansen, J.S.; Bojesen, S.E. Observational and genetic plasma YKL-40 and cancer in 96,099 individuals from the general population. *Int. J. Cancer* **2015**, *137*, 2696–2704. [CrossRef]
15. Yeo, I.J.; Lee, C.K.; Han, S.B.; Yun, J.; Hong, J.T. Roles of chitinase 3-like 1 in the development of cancer, neurodegenerative diseases, and inflammatory diseases. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *26*, 107394. [CrossRef] [PubMed]
16. Roslind, A.; Knoop, A.S.; Jensen, M.B.; Johansen, J.S.; Nielsen, D.L.; Price, P.A.; Balslev, E. YKL-40 protein expression is not a prognostic marker in patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *112*, 275–285. [CrossRef]
17. Wang, D.; Zhai, B.; Hu, F.; Liu, C.; Zhao, J.; Xu, J. High YKL-40 serum concentration is correlated with prognosis of Chinese patients with breast cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51127. [CrossRef]
18. Johansen, J.S.; Christensen, I.J.; Jørgensen, L.N.; Olsen, J.; Rahr, H.B.; Nielsen, K.T.; Laurberg, S.; Brunner, N.; Nielsen, H.J. Serum YKL-40 in risk assessment for colorectal cancer: A prospective study of 4,496 subjects at risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2015**, *24*, 621–626. [CrossRef]
19. Bielawski, K.; Rhone, P.; Bielawska, S.; Roś, D.; Brkić, A.; Zarychta, E.; Ruszkowska-Ciastek, B. Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate. *J. Physiol. Pharmacol.* **2019**, *70*, 455–466.
20. Hanahan, D.; Weinberg, R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 374–646. [CrossRef]
21. Christodoulatos, G.S.; Spyrou, N.; Kadillari, J.; Psallida, S.; Dalamaga, M. The role of adipokines in breast cancer: Current evidence and perspectives. *Curr. Obes. Rep.* **2019**, *8*, 413–433. [CrossRef]
22. Arai, Y.; Kamide, K.; Hirose, N. Adipokines and aging: Findings from centenarians and the very old. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2019**, *10*, 142. [CrossRef] [PubMed]

23. Playdon, M.C.; Bracken, M.B.; Sanft, T.B.; Ligibel, J.A.; Harrigan, M.; Irwin, M.L. Weight gain after breast cancer diagnosis and all-cause mortality: Systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*, djv275. [CrossRef] [PubMed]
24. Jarde, T.; Caldefie-Chezet, F.; Damez, M.; Mishellany, F.; Penault-Llorca, F.; Guillot, J.; Vasson, M.P. Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: A study on human primary breast carcinoma. *Oncol. Rep.* **2008**, *19*, 905–911. [CrossRef] [PubMed]
25. Ando, S.; Gelsomino, L.; Panza, S.; Giordano, C.; Bonofiglio, D.; Barone, I.; Catalano, S. Obesity, leptin and breast cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 62. [CrossRef] [PubMed]
26. Panno, M.L.; Naimo, G.D.; Spina, E.; Ando, S.; Mauro, L. Different molecular signaling sustaining adiponectin action in breast cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2016**, *31*, 1–7. [CrossRef]
27. Maroni, P. Leptin, adiponectin, and sam68 in bone metastasis from breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1051. [CrossRef]
28. Che, S.P.; DeLeonardis, C.; Shuler, M.L.; Stokol, T. Tissue factor-expressing tumor cells can bind to immobilized recombinant tissue factor pathway inhibitor under static and shear conditions in vitro. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0123717. [CrossRef]
29. Parise, C.A.; Caggiano, V. Breast cancer survival defined by the ER/PR/HER2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkers. *J. Cancer Epidemiol.* **2014**, *2014*, 469251. [CrossRef]
30. Gu, L.; Cao, C.; Fu, J.; Li, Q.; Li, D.H.; Chen, M.Y. Serum adiponectin in breast cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **2018**, *97*, e11433. [CrossRef]
31. Lennon, H.; Sperrin, M.; Badrick, E.; Renehan, A.G. The obesity paradox in cancer: A review. *Curr. Oncol. Rep.* **2016**, *18*, 56. [CrossRef]
32. Murphy, W.J.; Longo, D.L. The surprisingly positive association between obesity and cancer immunotherapy efficacy. *JAMA* **2019**, *321*, 1247–1248. [CrossRef] [PubMed]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Wprowadzenie do badania opublikowanego w pracy nr 3:

Ruszkowska-Ciastek B*, **Bielawski K***, Zarychta E, Rhone P. Impact of adjuvant treatment on heparanase concentration in invasive, unilateral breast cancer patients: results of a prospective single-centre cohort study. *J Clin Med.* 2021; 10(10): 2184. **IF: 4,964**; punktacja **MNiSW: 140 pkt**; (* Ruszkowska-Ciastek B i Bielawski K wnieśli równy wkład w powstanie publikacji).

Według danych American Cancer Society w USA inwazyjny rak piersi zostanie zdiagnozowany w ciągu życia u około 13% kobiet, a co piąta pacjentka umrze z tego powodu. Aktualnie pomimo wprowadzenia medycyny spersonalizowanej, nadal istnieje wysokie ryzyko śmiertelności z powodu nowotworu piersi, dlatego stale poszukuje się nowych terapii pozwalających na jak największe zmniejszenie liczby nawrotów oraz zgonów z przyczyn nowotworowych.

Naturalnymi atrybutami komórek nowotworowych są niekontrolowana proliferacja, oporność na apoptozę, zwiększony potencjał angiogeny oraz zdolność do migracji. Natomiast jednym z pierwszych etapów umożliwiających rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych i powstawanie przerzutów jest degradacja połączeń pomiędzy komórkami oraz pomiędzy komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową w pierwotnym miejscu guza.

Zarówno aktywność enzymatyczna jak i nieenzymatyczna heparanazy prowadzi do zmniejszenia integralności macierzy zewnątrzkomórkowej. Dodatkowo heparanaza na drodze enzymatycznej może uwalniać cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu związane z siarczanami heparanu ECM. Natomiast na drodze nieenzymatycznej heparanaza może aktywować układ krzepnięcia prowadząc bezpośrednio do stanu nadkrzepliwości oraz pobudzenia neoangiogenezy.

W publikacji 3 badaniem zostało objętych 80 pacjentek: 53 pacjentki po menopauzie (66%) oraz 27 pacjentek przed menopauzą (34%). Było to jednośrodkowe prospektywne badanie obejmujące pacjentki z potwierdzonym operacyjnym, pierwotnym i jednostronnym nowotworem piersi bez przerzutów odległych. Mediana czasu obserwacji wynosiła 55 miesięcy (Q1/Q3 – 49/59 miesięcy). Podczas obserwacji wystąpiło 11 zdarzeń (wskaźnik nawrotów 13,75%), w tym 6 zgonów z powodu choroby nowotworowej oraz 5 nawrotów

choroby. W odniesieniu do publikacji nr 1 i nr 2 w publikacji nr 3 nie odnotowano zmian wśród kryteriów włączenia i wyłączenia z badania.

Najczęściej obserwowanym typem molekularnym nowotworu piersi był typ luminalny A (47 pacjentek czyli 59% grupy badanej). Ponadto w grupie badanej zaobserwowano następujące występowanie wybranych cech kliniczno-patologicznych: wielkość guza < 2cm u 53 pacjentek (66%) oraz brak zajęcia węzłów chłonnych u 61 pacjentek (76%). W publikacji tej przeanalizowano również zastosowany typ leczenia operacyjnego oraz zastosowanie leczenia uzupełniającego. Większość grupy badanej, 65 pacjentek (81%) zostało poddanych leczeniu oszczędzającemu pierś. Natomiast w ramach terapii adjuwantowej chemioterapię zastosowano u 38 badanych (47,5%). Leczenie hormonalne zastosowano u 68 pacjentek (85%).

W całej grupie badanej dwukrotnie oznaczono stężenie heparanazy przy użyciu testów immunoenzymatycznych (ELISA). Pierwsze pobranie krwi w celu określenia stężenia heparanazy przed leczeniem odbywało się 24 h przed zabiegiem chirurgicznym natomiast po ok. 8 miesiącach (Q1/Q3 – 6,2/10,7) odbywało się drugie pobranie w celu oceny stężenia heparanazy po leczeniu.

Celem badania była ocena zmiany stężenia heparanazy przed i po leczeniu oraz określenie przydatności diagnostycznej tych parametrów w celu przewidywania wystąpienia progresji oraz nawrotu choroby nowotworowej u pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi.

W **trzeciej publikacji** wykazano zarówno prawie czterokrotne obniżenie stężenia heparanazy w całej grupie badanej w wyniku zastosowania leczenia adjuwantowego jak i istotną korelację pomiędzy stężeniem heparanazy przed leczeniem oraz po leczeniu. Stwierdzono także wyższe stężenia heparanazy przed i po leczeniu w grupie pacjentek z nowotworami bez ekspresji receptorów estrogenowych w porównaniu do grupy pacjentek z nowotworami z ekspresją receptorów estrogenowych. Zarówno przed jak i po leczeniu odnotowano znacznie wyższe stężenia heparanazy w grupie pacjentek z guzami o średnicy od 2 do 5 cm (T2) w porównaniu do grupy pacjentek z guzami nowotworowymi o średnicy < 2 cm (T1). Ponadto wykazano wyższe stężenie heparanazy po leczeniu u pacjentów z podtypem potrójnie ujemnym w porównaniu do pacjentów z podtypem luminalnym B HER2- raka piersi.

Kolejnym etapem analizy statystycznej była ocena stężeń heparanazy przed i po leczeniu w zależności od zastosowanego leczenia. Wykazano, że stężenia heparanazy przed i po leczeniu różnią się w zależności od rodzaju zastosowanej terapii hormonalnej. Wśród

pacjentek, u których zastosowano hormonoterapię wyłącznie tamoksyfenem odnotowano najniższe stężenie heparanazy przed leczeniem. Po leczeniu najniższym stężeniem heparanazy wyróżniała się grupa pacjentek poddanych terapii łączącej zastosowanie tamoksyfenu i inhibitorów aromatazy. Natomiast najwyższe stężenie heparanazy przed leczeniem oraz po leczeniu występowało u pacjentek, u których nie zastosowano żadnej hormonoterapii.

Wyniki analizy przeżycia uzyskane w ramach **3 badania potwierdziły** wyniki uzyskane **w 1 badaniu**. Większą częstość nawrotów choroby zaobserwowano w grupie pacjentów z wysokim początkowym stężeniem heparanazy. Wykazano także, że pacjenci z ekspresją receptora progesteronowego, u których doszło do nawrotu choroby charakteryzowali się wyższym stężeniem początkowym heparanazy niż pacjenci bez nawrotu choroby. Natomiast wśród pacjentów bez ekspresji receptora progesteronowego nawrót choroby wystąpił u osób z niższym stężeniem początkowym heparanazy.

Ostatnim etapem analizy statystycznej z wykorzystaniem regresji logistycznej było określenie czynników wpływających na niskie lub wysokie stężenie początkowe heparanazy oraz czynników wpływających na niski lub wysoki liczbowy spadek stężenia heparanazy po zakończeniu leczenia adjuwantowego. W analizie jednoczynnikowej pacjenci z nadwagą i pacjenci z guzem o średnicy od 2 do 5 cm (T2) wykazywali mniejszą szansę na niższe stężenie heparanazy przed leczeniem. Natomiast pacjenci z dodatnim statusem ER i PR wykazywali większą szansę na niższe stężenie początkowe heparanazy.

Na podstawie badania uzyskano następujące wnioski. Leczenie raka piersi obniża stężenie heparanazy, niezależnie od zastosowanego schematu leczenia. Wysokie stężenie heparanazy przed leczeniem zwiększa prawdopodobieństwo nawrotu choroby nowotworowej. Dodatkowo stężenie heparanazy przed leczeniem zależy od wielkości guza (wyższe stężenie - guzy T2) oraz braku ekspresji ER i PR co potwierdza jego skojarzenie z bardziej agresywnym fenotypem raka piersi. Natomiast stężenie heparanazy po leczeniu nie wykazuje funkcji prognostycznej w przewidywaniu nawrotu choroby oraz zależy przede wszystkim od stężenia heparanazy przed leczeniem.

Article

Impact of Adjuvant Treatment on Heparanase Concentration in Invasive, Unilateral Breast Cancer Patients: Results of a Prospective Single-Centre Cohort Study

Barbara Ruskowska-Ciastek ^{1,*}, Kornel Bielawski ^{1,†}, Elżbieta Zarychta ¹ and Piotr Rhone ²

¹ Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum, 85-094 Bydgoszcz, Poland; kornel@doktorant.umk.pl (K.B.); erhone@gmail.com or zarychta@abs.umk.pl (E.Z.)

² Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre Prof. F. Łukaszczyk Memorial Hospital, 85-796 Bydgoszcz, Poland; rhonep@co.bydgoszcz.pl or prhone@wp.pl

* Correspondence: bruskowska@cm.umk.pl or ruszkowska.basia@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Ruskowska-Ciastek, B.; Bielawski, K.; Zarychta, E.; Rhone, P. Impact of Adjuvant Treatment on Heparanase Concentration in Invasive, Unilateral Breast Cancer Patients: Results of a Prospective Single-Centre Cohort Study. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2184. <https://doi.org/10.3390/jcm10102184>

Academic Editor: Yanyuan Wu

Received: 23 April 2021

Accepted: 14 May 2021

Published: 18 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: In recent years, great progress has been made in the treatment of breast cancer, but it is still one of the ten leading causes of death in women. The aim of the study was to evaluate the heparanase concentration of invasive breast cancer (IBrC) patients, before and after cancer adjuvant treatment. Methods: Eighty patients with stage IA to IIB IBrC receiving adjuvant treatment were included prospectively in this study. The heparanase concentrations were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. A univariate analysis was used to estimate the factors influencing the low or high pre-treatment concentration of heparanase and the low or high numerical decrease in heparanase concentration after completion of adjuvant treatment. Results: Treatment reduced the concentration of heparanase by almost four times in the general IBrC cohort. Higher levels of pre- and post-treatment heparanase were noted in oestrogen receptor-negative cancers than in positive ones. A higher post-treatment concentration of heparanase was found in patients with a triple-negative tumour compared to patients with a luminal B HER2 negative type of IBrC. Overweight IBrC subjects and those with a tumour diameter of ≥ 2 cm demonstrated a lower chance of a lower pre-treatment heparanase concentration. Interestingly, a pre-treatment heparanase concentration is the main predictor of the changes in heparanase concentration after adjuvant treatment. Follow-up revealed significantly lower progression-free survival (PFS) rates in IBrC patients with a pre-treatment concentration of heparanase higher than 181.46 pg/mL (PFS = 80%). Conclusions: Our findings provide supporting evidence that IBrC therapy reduced the heparanase levels, regardless of treatment patterns and a pre-treatment concentration of heparanase may serve as a prognostic indicator for future outcomes.

Keywords: adjuvant therapy; heparanase; breast cancer; disease recurrence

1. Introduction

Invasive breast cancer (IBrC) is one of the ten leading causes of death among women worldwide. According to data of the American Cancer Society, in the USA, about 13% of women in their lifetime will be diagnosed with IBrC, and every fifth patient will die due to this [1,2]. Therefore, early detection of a tumour is a fundamental component in IBrC therapy that ameliorates survival and the quality of the patient's life. Due to the large diversity of IBrC phenotypes, the choice of an adjuvant therapeutic approach depends on molecular subtype, histological type, stage, menopausal status, and other co-morbidities [2,3].

Generally, there are two treatment strategies for IBrC: local, relying on surgery and radiotherapy; or systemic, composed of chemotherapy, endocrine therapy, or targeted

therapies [4]. According to the American Cancer Society data, the most common surgical procedure among patients with stage I and II is breast-conserving surgery (BCS) with adjuvant radiotherapy, with similar survival rates to mastectomy [2]. Oestrogen receptor (ER) or progesterone receptor (PgR)-positive breast cancer is recognised in approximately 70–80% of IBrC patients [5]. These subjects can benefit from long-term endocrine treatment via a reduction in the risk of local and distant relapses. However, particular tumour profiles are essential in establishing the prognosis of patients with hormone receptor positive IBrC undergoing treatment with selective ER modulators (SERMs) and aromatase inhibitors (AIs) such as tamoxifen and anastrozol, respectively. Patients with luminal A-like tumours treated with tamoxifen have a better prognosis than those with luminal B-like tumours, since the latter shows a higher proliferation/mitotic index (Ki67) [5,6]. However, lack of receptor expression is associated with the most severe breast cancer phenotype, accounting for 10–20% of all IBrC, and called triple-negative IBrC. These patients present a higher relapse rate, are increasingly prone to forming brain or lung metastases, and have a reduced overall survival rate due to the failure of current targeted therapies [7]. Despite the introduction of precision medicine, there still is a high risk of short- and long-term mortality due to breast malignancy, thus new therapies are constantly being sought that will allow the greatest possible reduction in the number of relapses, deaths, or over-treatment of low-risk patients [8].

Uncontrolled proliferation, resistance to apoptosis, angiogenic potential, and motility are natural cancer cell attributes [9]. One of the first steps in tumour cell invasion and secondary spread is the breakdown of connections between cells and between cells and the extracellular matrix (ECM) at the primary site of the tumour. Local remodelling of the basement membrane (BM) also facilitates this process [10,11]. Heparanase is an endo- β (1,4)-D-glucuronidase able to hydrolyse heparan sulphate (HS) side chains into 5 to 7 kDa fragments found in the BM and ECM [4,12–14]. Interestingly, Hunter et al. have observed a reduction in HS levels at the invasive fronts of tumours [15]. Heparanase exerts its action via enzymatic and non-enzymatic ways. Interestingly, both heparanase activities are equally involved in cancer invasion and dissemination, allowing neoplastic cells to invade the tumour site locally and spread to distant sites [10,11]. By cleaving ECM proteins, heparanase can release and thus activate several latent growth factors including vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF) attached at this site, which leads to the promotion of proliferation, migration, invasion, and cancer cell spread. Furthermore, the non-enzymatic activity of heparanase is associated with enhancement of the coagulation system and sets off a vicious circle [12,14] as heparanase is considered as a tissue factor (TF) cofactor; higher bioavailability of TF is associated with thrombin production and fibrin deposition. Thrombin activates platelets, which release heparanase from their α granules. TF directly influences the release of VEGF from endothelial cells [14]. Thus, heparanase directly leads to hypercoagulability and a neoangiogenic switch by upregulation of TF and VEGF. It is worth mentioning that heparanase exhibits a positive side through involvement in tissue regeneration and repair, wound healing, hair growth, dendritic cell migration, and the implantation of embryos during the early stages of pregnancy [12].

Heparanase over-secretion is observed in several solid tumours, sarcomas, haematological neoplasms, and is associated with aggressive tumour behaviour, a worse prognosis, and chemo-resistance [10,13]. According to our previous study, we suggest that patients considered low risk of relapse based on their pre-treatment heparanase values may better respond to adjuvant treatment [16]. In order to avoid distant metastasis, there is a growing need to discover novel non-invasive biomarkers for primary IBrC and a treatment response that allows the detection of changes in mammary glands at an early stage as well as potential therapy resistance. In the present study, we hypothesised that surgical procedures and standard adjuvant therapies influence the change in heparanase concentration of patients with unilateral, invasive breast cancer. We also evaluated whether pre- and post-treatment

levels of heparanase are a valuable biomarker for assessing disease relapse and monitoring disease progression in patients with IBrC.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Population

This was an adjuvant, observational, prospective, single-centre study including female patients with histologically proven resectable, unilateral, primary IBrC (M0). Since this was an observational study performed in a daily clinical practice setting, the sample size was dependent on obtaining patients' consent for participation in the study and confirmation of the will to donate blood at least twice. This study was undertaken in accordance with the Declaration of Helsinki, following the guidelines and approval of the local Ethics Committee (permission number: KB 547/2015). Informed consent was obtained from all participants included in the study. Subjects with IBrC ($n = 80$) were under the care of medical staff from the Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre in Bydgoszcz, Poland. The decision between BCS and mastectomy or sentinel lymph node biopsy and axillary lymph node dissection was determined according to institutional guidelines.

2.2. Recruitment Criteria

For all patients enrolled in the study, baseline characteristics, including demographic data and medical history were obtained during a medical interview. Female patients were eligible for inclusion in the study if they met the following criteria: (1) age 40 years or older, (2) primary, (3) unilateral, (4) lack of distant metastases, (5) stage IA to IIB invasive breast cancer, (6) full follow-up information. To minimise confounding with comorbid conditions that could influence heparanase concentration, patients with systemic disorders such as (1) cardiovascular disease, (2) hepatic, kidney failure, and endocrine diseases, (3) acute infections, (4) autoimmune disorders, (5) previous history of malignant disease, (6) bilateral invasive IBrC, (7) carcinoma in situ were excluded. Distant metastases were excluded by thoraco-abdomin-pelvic tomography and bone scintigraphy.

2.3. Tumour Characteristics

Tumour and nodal stage (7th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM classification of malignant tumours) were derived from all the included patients. Expression of oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), Ki67 were obtained immunohistochemically in order to stratify patients according to the molecular subtypes of IBrC. The molecular subtypes of IBrC included luminal A (ER+/PgR+/HER2-/Ki67 < 20%), luminal B HER2(-) (ER+/PgR+/-/HER2-/Ki67 ≥ 20%), luminal B HER2(+) (ER+ and/or PR+/HER2+/Ki67 – all values), non-luminal HER2(+) (ER-/PR-/HER2+/Ki67 – all values), and triple-negative (ER-/PR-/HER2-/Ki67 – all values). Tumours were graded according to the Elston–Ellis grading system based on three components: (1) the amount of tubule formation, (2) the nuclear grade, and (3) the mitotic index, in order to stratify the breast cancer. Grade 1 with well-differentiated cells (low grade), grade 2 with moderately differentiated cells (intermediate grade), and grade 3 with poorly differentiated cells (high grade).

2.4. Therapeutic Procedures

Standard guidelines related to treatment patterns established by the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines for Practice were implemented in all patients. BCS was performed in 65 patients (81%), while 15 patients (19%) had a mastectomy. Thirty-eight subjects (47.5%) had adjuvant chemotherapy administered, applied in four to six cycles. Thirty cases received anthracycline-containing drugs and non-anthracycline-containing drugs were used in eight patients. The chemotherapy patterns and dosages depended on the institutional guidelines. A complete blood count and organ function test was performed before each chemotherapy cycle. In 68 patients (85%), endocrine

therapy was administered. The type of treatment depended on menopausal status; 41 (51%) used tamoxifen (Egis Pharmaceuticals, Budapest, Hungary), 20% ($n = 16$) of these patients receiving aromatase inhibitors (AIs) (Arimidex (anastrozol), AstraZeneca, Cambridge, United Kingdom) combination of tamoxifen and AIs was used in seven patients (9%), but four patients (5%) were given another endocrine scheme, in an adjuvant setting. Twelve subjects did not receive endocrine therapy due to a small tumour diameter or a triple-negative (ER-/PR-/HER2-/Ki67—all values) subtype of IBrc. Radiotherapy was delivered according to institutional guidelines within 1–2 weeks after completion of the adjuvant chemotherapy. In the study group, a median dose of 45 gray (Gy) was delivered in 17–20 fractions over 4–6 weeks to the chest wall by applying tangential photon fields, and for subjects with N1 status, to the supraclavicular, infraclavicular, and axillary nodes using an anterior field matched to the tangential fields. Fifty-two (65%) breast-conserved patients received, in addition, a sequential boost of 10 Gy delivered in five fractions to the initial tumour bed using a direct electron field. Only 15 patients did not require adjuvant radiotherapy (20%). In this study, no patients received immunotherapy between the first and second blood collection. Erythropoietin or granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) supplemented treatments were not administered.

2.5. Follow-Up and Survival Status

Cumulative survival was demonstrated by Kaplan–Meier graphs. During a median follow-up of 55.0 months (IQR 49–59 months), 11 events occurred including three (3.75%) loco-regional recurrences, two (2.5%) distant metastases, and six (7.5%) deaths. The recurrence rate was 13.75%. The fates of all included patients are regularly followed and collected from the moment the first blood sample was taken. The progression-free survival (PFS) was defined as the period between the enrolment date and the day of radiological evidence of disease relapse or cancer-related death, whichever occurred first.

2.6. Blood Samplings

Blood samples from all patients were collected twice in accordance with standard procedures. The first blood collection occurred 24 h before the surgical procedure (I—pre-treatment values). Collection of the second blood specimen (II—post-treatment values) took place a maximum of three months after the last cytotoxic infusion and generally eight months (IQR 6.2–10.7) after the tumour removal procedure to avoid the direct impacts of chemotherapy or surgical wound healing on the level of heparanase.

2.7. Biochemical Measurements

Pre-treatment and post-treatment blood samples were collected from a peripheral venipuncture by a fresh needle insertion procedure. This consisted of the following: Blood was drawn by venipuncture into BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA tubes (Becton Dickinson, Plymouth, UK) containing potassium ethylene-diaminetetraacetic acid in order to measure the concentration of heparanase. A commercially available enzyme-linked immunosorbent assay method was used to determine the amount of heparanase (Cloud-Clone Corp., Katy, TX, USA; catalogue number: SEA711Hu) in K₂EDTA plasma, which was prepared by centrifugation at 3000 g at 4 °C for 15 min and then stored in aliquots at –80 °C until used. For all kits, the reaction mixture was added to a 96-well plate. Laboratory analysis was carried out blindly to clinical data.

The limit of heparanase detection was <12.1 pg/mL. The intra-assay coefficient of variation (within-run) was <10% with an inter-assay coefficient of variation (run-to-run) of <12%. The subjects were separated as having low ($n = 40$) or high ($n = 40$) values, dichotomised using a cut-off for pre-treatment heparanase of 181.46 pg/mL, based on the median value for the whole study population. Additionally, based on the median concentration of post-treatment heparanase of 47.14 pg/mL, the patients were divided into two equal groups with low ($n = 40$) and high ($n = 40$) heparanase concentrations

after tumour resection and completion of chemotherapy. The obtained results allowed the numerical and percentage decrease in heparanase concentration to be determined.

2.8. Immunohistochemical (IHC) Analysis of Molecular Determinants

Paraffin-embedded sections were prepared for immunohistochemistry staining (IHC) analysis of oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and expression of Ki67. Immunostained specimens were examined by a pathologist who was blind to the clinical data of the patients and scored according to the intensity of staining. ER or PgR status >1% were considered as positive. HER2 scores were estimated using the standard American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines reporting system on a scale of 0, 1+, 2+, and 3+. Tumours with 0 or 1+ scores were established as HER2-negative and those with 3+ scores were considered as HER2-positive. A 2+ score was recognised as equivocal and was tested for HER2 gene amplification by fluorescent in situ hybridisation techniques (FISH), in accordance with the manufacturer's instructions. For the Ki67- proliferation index, we used a 15% threshold as the limit to define high/low proliferative cases [17]. Detailed procedures are published in our previous paper [16].

2.9. Statistical Methods

The distribution of variables was checked initially by the Shapiro-Wilks normality test. Data were expressed as medians and interquartile ranges (IQR, 25th–75th percentile). The Mann–Whitney and the ANOVA Kruskal–Wallis tests were used to compare non-dependent subgroups. Furthermore, the data were compared by means of a non-parametric Wilcoxon signed-rank test for two dependent variables. In order to determine the differences in the frequency of occurrence of selected features between patients with and without disease recurrence, multi-way tables along with Pearson's χ^2 values were provided. Progression-free survival (PFS) was calculated from the date of enrolment until the documented disease progression or cancer-related death. The association of pre- and post-treatment heparanase concentrations as risk factors with time-to-event endpoints were analysed with the log-rank test or the F Cox test and the Kaplan–Meier method was used to plot the corresponding PFS curves. The relationship between the plasma heparanase levels and clinical determinants of breast cancer was determined using a logistic regression method to obtain an odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI). All performed analyses were summarised and reported in tables and figures. All *p*-values were two-tailed and a *p*-value < 0.05 was considered significant. All statistical analyses were performed using dedicated Statistica 13.1 software (StatSoft, Cracow, Poland).

3. Results

Baseline Characteristics of the Study Subjects

The median observation period was 55 months (range 49–59 months). During follow-up, 11 events occurred (relapse rate 13.75%), including 6 deaths and 5 disease recurrences. A total of 80 treatment-naïve patients, with histologically documented, stage IA–IIB IBc were enrolled in the study from November 2015 to June 2017. Patient characteristics are given in Tables 1–3. The median age was 54.5 years (interquartile range (IQR) 49–59 years). The median body mass index value was 26.3 kg/m² (IQR 22.54–28.97 kg/m²). The tumours were small and moderate with a median size of 1.7 cm (range 0.4–3.5 cm). A total of 53 patients (66%) were postmenopausal. Thirty-nine patients had stage IA (49%), tumour grades 1 + 2 were confirmed in 64 cases (80%) and tumours were ER or PgR positive in 86% and 79%, respectively. 24% (*n* = 19) of the patients had metastasis to axillary lymph nodes. None of the patients had neoadjuvant treatment provided.

Table 1. The impact of adjuvant treatment on the heparanase concentration with respect to age, menopausal status, body mass index (BMI).

Feature/ Number of Patients (%)	Pre-Treatment Heparanase Concentration (pg/mL)	Post-Treatment Heparanase Concentration (pg/mL)	p-Values
80 (100%)	181.46 138.86/269.60	47.14 23.20/86.92	<0.0001
Age	<i>p</i> = 0.8595	<i>p</i> = 0.2982	
<55 years 40 (50%)	179.23 133.57/280.18	43.78 17.61/74.01	<0.0001
≥55 years 40 (50%)	182.59 142.06/256.81	50.38 24.23/94.06	<0.0001
Menopausal status	<i>p</i> = 0.2396	<i>p</i> = 0.3159	
Premenopausal 27 (34%)	165.88 123.09/257.96	42.06 16.91/77.55	<0.0001
Postmenopausal 53 (66%)	188.24 144.19/270.91	47.72 24.18/90.43	<0.0001
BMI	<i>p</i> = 0.2020	<i>p</i> = 0.9578	
≤24.9 kg/m ² 38 (47%)	170.30 134.32/252.87	43.78 24.18/77.55	<0.0001
25–29.9 kg/m ² 27 (34%)	213.74 150.63/286.91	53.31 23.2/97.68	<0.0001
30–39.9 kg/m ² 15 (19%)	157.13 137.80/257.96	47.02 18.00/143.10	0.0003

BMI: body mass index.

Table 2. The heparanase concentrations according to molecular characteristics in breast cancer subjects.

Feature/ Number of Patients (%)	Pre-Treatment Heparanase Concentration (pg/mL)	Post-Treatment Heparanase Concentration (pg/mL)	p-Values
Expression of Ki67	<i>p</i> = 0.0967	<i>p</i> = 0.5052	
<15% 42 (53%)	168.09 134.32/213.74	48.72 24.08/90.43	<0.0001
≥ 15% 38 (47%)	225.68 142.05/297.89	43.78 22.71/78.88	<0.0001
Expression of HER2	<i>p</i> = 1.0000	<i>p</i> = 0.9436	
Negative 72 (90%)	183.71 138.86/268.29	47.37 23.20/86.92	<0.0001
Positive 8 (10%)	164.81 131.53/390.19	46.38 21.87/109.70	0.0133
ER status	<i>p</i> = 0.0279	<i>p</i> = 0.0498	
Positive 69 (86%)	170.30 135.68/257.96	41.95 22.71/78.88	<0.0001
Negative 11 (14%)	268.29 213.74/378.49	73.88 45.50/146.50	0.0026
PgR status	<i>p</i> = 0.0253	<i>p</i> = 0.1595	
Positive 63 (79%)	170.30 135.68/252.87	42.06 22.23/80.49	<0.0001
Negative 17 (21%)	265.69 197.40/378.49	63.43 28.41/143.40	0.0001

Ki67: proliferation marker; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; ER: oestrogen receptor; PgR: progesterone receptor.

Table 3. The heparanase concentrations with respect to clinical and pathological characteristics in breast cancer subjects.

Feature/ Number of Patients (%)	Pre-Treatment Heparanase Concentration (pg/mL)	Post-Treatment Heparanase Concentration (pg/mL)	p-Values
Molecular subtypes	$p = 0.5157$ II vs. IV 0.2756	$p = 0.3135$ II vs. IV 0.0494	
Luminal A 47 (59%)	165.88 134.32/257.96	47.02 22.23/90.29	<0.0001
Luminal B HER2(-) 16 (20%)	192.82 156.05/268.30	32.61 23.10/59.03	0.0002
Luminal B HER2(+) or non-Luminal HER2(+) 8 (10%)	164.81 131.53/390.19	46.38 21.87/109.70	0.0133
Triple-negative 9 (11%)	245.32 213.74/284.21	73.88 55.25/143.40	0.0077
Tumour diameter	$p = 0.0281$	$p = 0.0128$	
T1 (<2 cm) 53 (66%)	165.88 135.68/228.10	35.72 22.13/67.25	<0.0001
T2 (≥2 cm < 5 cm) 27 (34%)	257.96 157.13/297.89	70.47 34.42/131.40	<0.0001
Nodal status	$p = 0.5224$	$p = 0.1277$	
N0 61 (76%)	183.71 142.05/276.15	53.31 23.20/102.9	<0.0001
N1 19 (24%)	179.21 131.46/252.87	34.53 23.20/55.25	<0.0001
Tumour stage	$p = 0.3676$	$p = 0.4549$	
IA 39 (49%)	170.30 139.92/240.35	45.50 22.13/83.54	<0.0001
IIA + IIB 41 (51%)	197.40 137.80/270.91	51.03 24.68/90.29	<0.0001
Tumour grade	$p = 0.9099$	$p = 0.7252$	
G1 + G2 64 (80%)	176.98 140.99/269.60	47.49 22.72/86.92	<0.0001
G3 16 (20%)	219.71 131.49/274.95	43.73 25.81/111.95	0.0002

HER2: human epidermal growth factor receptor 2.

In the present study, we analysed the potential benefit of pre- and post-treatment heparanase concentration as a marker for breast tumour invasion, pro-angiogenic phenotype, treatment response, and prognosis. Adjuvant treatment reduced the concentration of heparanase in the general IBrc cohort, $p < 0.0001$, by almost four times. A similar decreasing effect was observed with regard to age, menopausal status, body mass index (Table 1).

Table 2 presents the impact of adjuvant treatment on heparanase concentrations in terms of selected parameters characterising the molecular nature of breast cancer. The adjuvant treatment led to a significant decrease in heparanase concentration with respect to molecular determinants. Interestingly, the pre- and post-treatment heparanase concentrations were significantly different with respect to hormonal receptor status. Higher levels of pre- and post-treatment heparanase in oestrogen receptor-negative cancers ($p = 0.0279$ and $p = 0.0498$, respectively) than in positive ones were noted. Additionally, a significantly higher pre-treatment concentration of heparanase was observed in progesterone receptor-negative cases ($p = 0.0253$).

Regardless of molecular type, tumour diameter, lymph node involvement, staging, and grade of tumour, the concentration of heparanase also significantly decreased after adjuvant treatment (Table 3). Depending on the tumour diameter, significantly higher pre- ($p = 0.0281$) and post-treatment ($p = 0.0128$) concentrations of heparanase were obtained in patients with T2 tumours (≥2 cm) with respect to T1 (<2 cm). A higher post-treatment

concentration of heparanase was found in patients with a triple-negative tumour compared to patients with a luminal B HER2 negative type of IBrC ($p = 0.0494$); however, the pre-treatment heparanase level did not differ significantly between these groups.

The next step of the statistical analysis was to assess pre- and post-treatment heparanase concentrations depending on the type of introduced treatment (Table 4). Regardless of the applied therapy, the post-treatment concentrations of heparanase also decreased. It is worth noting that pre- ($p = 0.0299$) and post-treatment ($p = 0.0321$) concentrations of heparanase vary with respect to the type of endocrine therapy. The lowest pre-treatment concentration of heparanase was found in patients who will later qualify for tamoxifen therapy but the highest level was obtained among patients without endocrine therapy (this group consisted of patients with a triple-negative or small size IBrC). The lowest post-treatment concentration of heparanase was noted in the group of IBrC cases who received a combination of tamoxifen and inhibitor aromatase treatment.

Table 4. The heparanase concentrations according to the types of surgery and adjuvant therapy in IBrC subjects.

Feature/ Number of Patients (%)	Pre-Treatment Heparanase Concentration (pg/mL)	Post-Treatment Heparanase Concentration (pg/mL)	<i>p</i> -Values
	$p = 0.9029$	$p = 0.9029$	
BCS + Radiotherapy- BCT	183.71	47.25	<0.0001
65 (81%)	139.92/276.15	22.71/83.54	
Mastectomy	170.30	38.47	0.0003
15 (19%)	137.80/257.96	28.41/90.29	
	$p = 0.6731$	$p = 0.8818$	
Chemotherapy	200.99	46.38	<0.0001
Anthracycline	131.46/297.89	26.83/72.81	
30 (37.5%)	170.30	48.69	0.0003
Non-anthracycline	143.14/219.71	18.49/91.30	
8 (10%)	179.23	47.37	<0.0001
No	139.92/257.96	22.13/90.43	
42 (52.5%)			
	$p = 0.0299$	$p = 0.0321$	
Endocrine therapy	150.63	42.06	<0.0001
Tamoxifen	131.46/225.68	24.08/80.49	
41 (51%)	191.66	42.78	0.0002
Inhibitor aromatase	174.76/277.60	24.09/105.74	
16 (20%)	183.71	16.91	0.0233
Tamoxifen and inhibitor	154.96/286.91	12.73/47.02	
aromatase	174.80	39.65	0.1336
7 (9%)	124.13/229.93	19.96/59.76	
Other type	276.25	102.64	0.0015
4 (5%)	220.92/454.46	50.38/156.05	
No			
12 (15%)			

BCS- breast-conserving surgery; BCT- breast-conserving therapy.

Figure 1 shows a significant positive correlation between a pre-treatment heparanase levels with post-treatment concentration of heparanase ($p = 0.0003$).

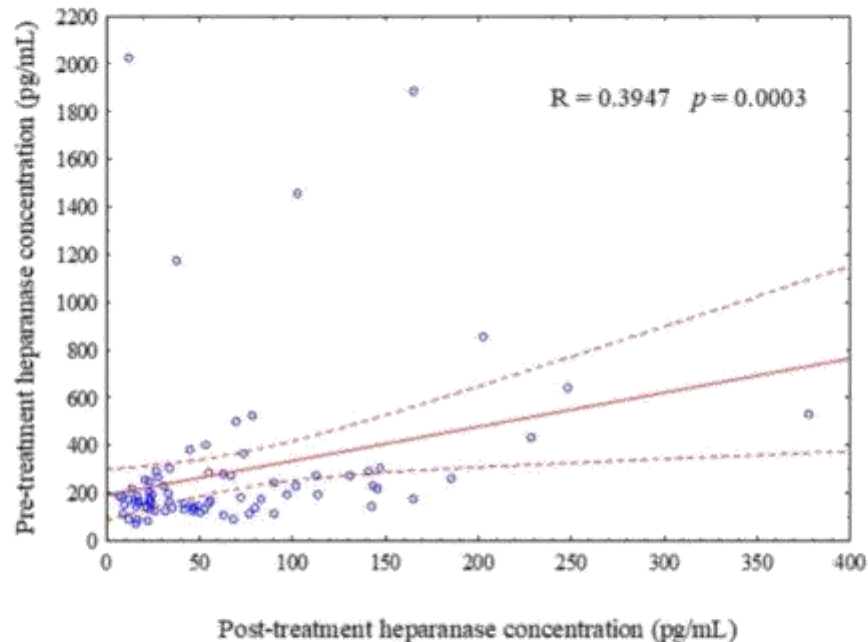


Figure 1. Scatter plot shows a positive of correlation between a pre-treatment with a post-treatment concentration of heparanase.

Interestingly, Figure 2A presents that the longer follow-up confirmed our previous findings [16] that a significantly higher incidence of disease relapse is observed in breast cancer patients with higher pre-treatment levels of heparanase compared to lower pre-treatment levels counterparts (log-rank $p = 0.0431$).

Figure 2B demonstrates the post-treatment evaluation of heparanase levels with respect to disease relapse. The probability of survival without recurrence of the neoplastic disease among patients with a post-treatment heparanase concentration higher than 47.14 pg/mL (12.5%) did not differ significantly (log-rank $p = 0.3537$) with regard to patients with a heparanase concentration lower than 47.14 pg/mL (15%).

Additionally, IBrC patients were divided due to numerical and percentage changes in pre- and post-treatment heparanase concentrations (Figure 3A,B, respectively). Progression-free survival was lower in (log-rank $p = 0.0477$) in those patients with numerical changes in heparanase concentration above 137.74 pg/mL. Figure 3B showed that progression-free survival did not differ with regard to a low or high percentage change in pre- and post-treatment heparanase concentrations (log-rank $p = 0.1570$).

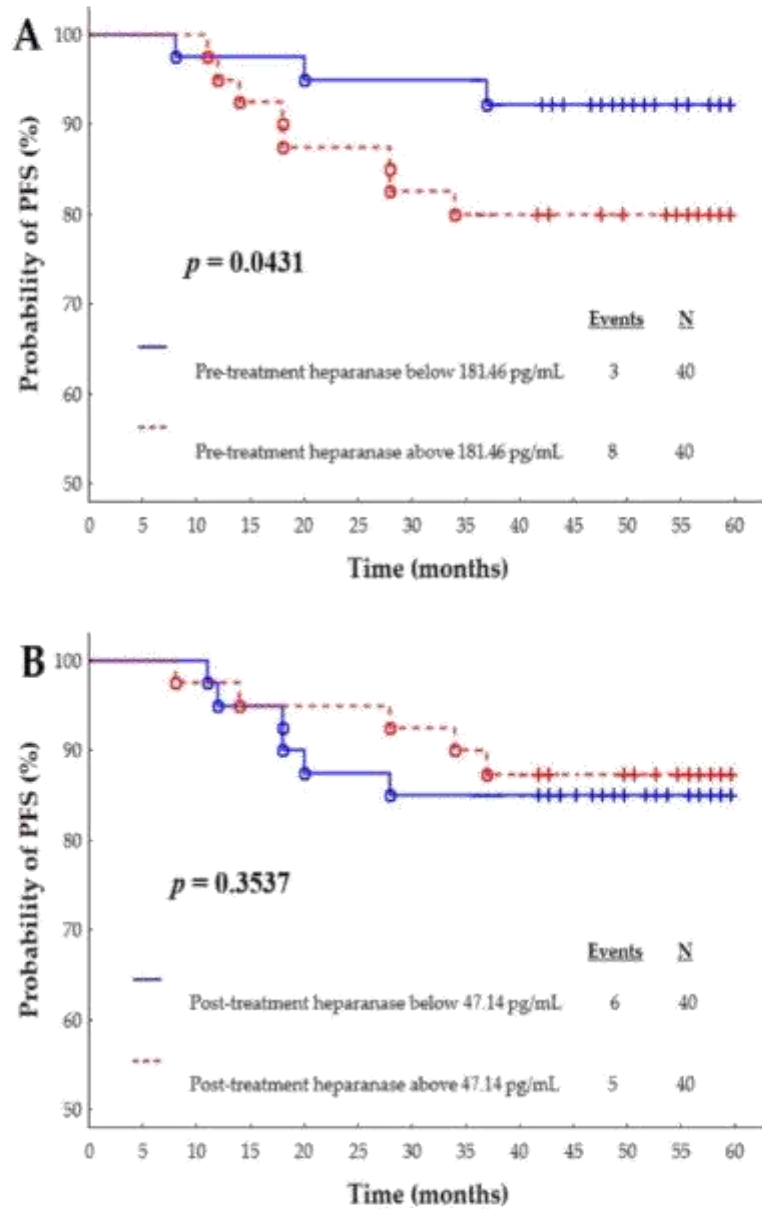


Figure 2. Kaplan-Meier survival curves depending on pre-treatment (A) and post-treatment (B) heparanase concentrations. The pre-treatment and post-treatment cut-offs for heparanase were set at 181.46 pg/mL and 47.14 pg/mL, respectively.

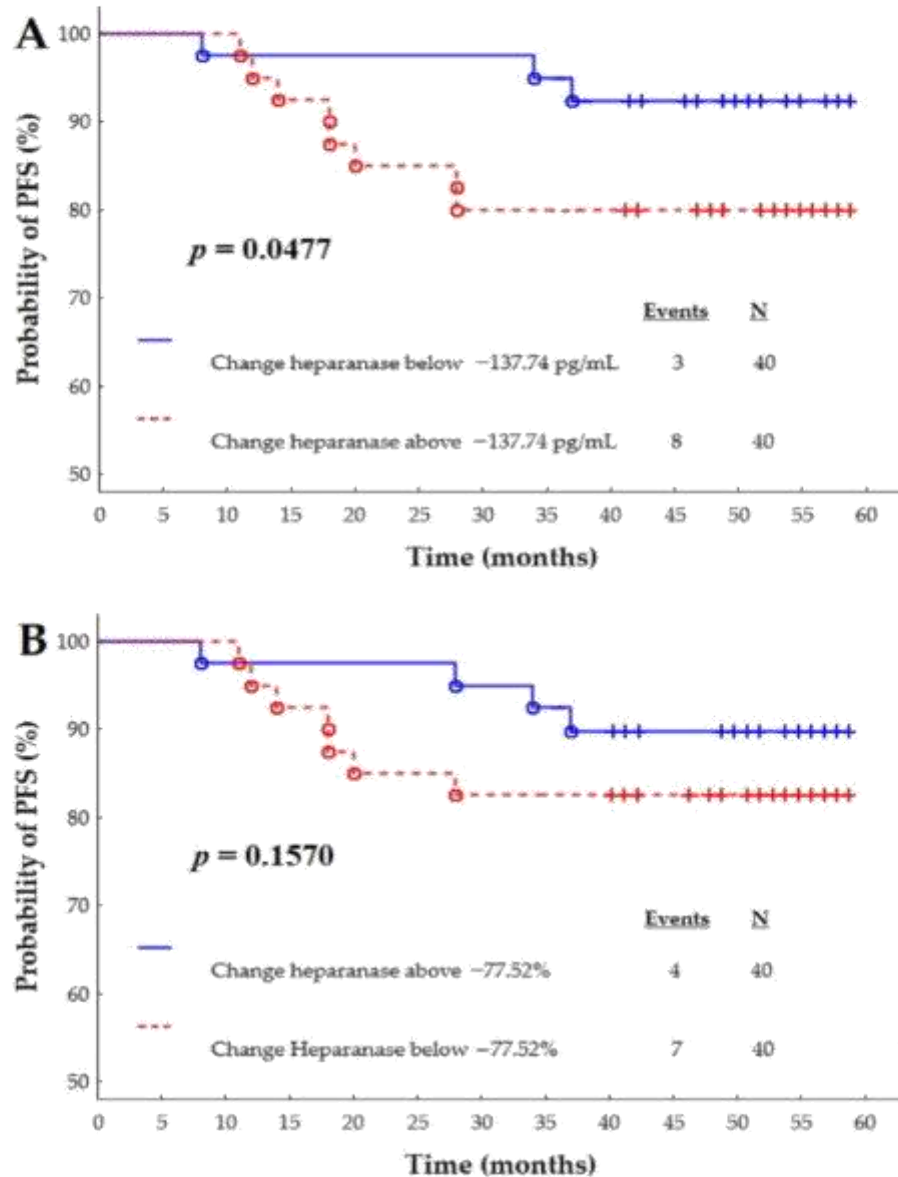


Figure 3. Kaplan-Meier survival curves depending on numerical (A) and percentage (B) changes of heparanase concentrations. The numerical and percentage changes cut-offs for heparanase were established at -137.74 pg/mL and -77.52% , respectively.

Figure 4 shows a significant difference in the pre-treatment concentration of heparanase ($p = 0.0009$) depending on progesterone receptor expression and disease relapse. Interestingly, patients with a positive PgR expression who developed a disease relapse showed a higher pre-treatment concentration of heparanase than in the patients without a disease relapse. However, among patients with a negative expression of PgR, disease recurrence occurred in those with a lower pre-treatment concentration of heparanase. This may indicate that a high pre-treatment concentration of heparanase may be a negative prognostic factor, thus other cancer-related factors should be taken into account.

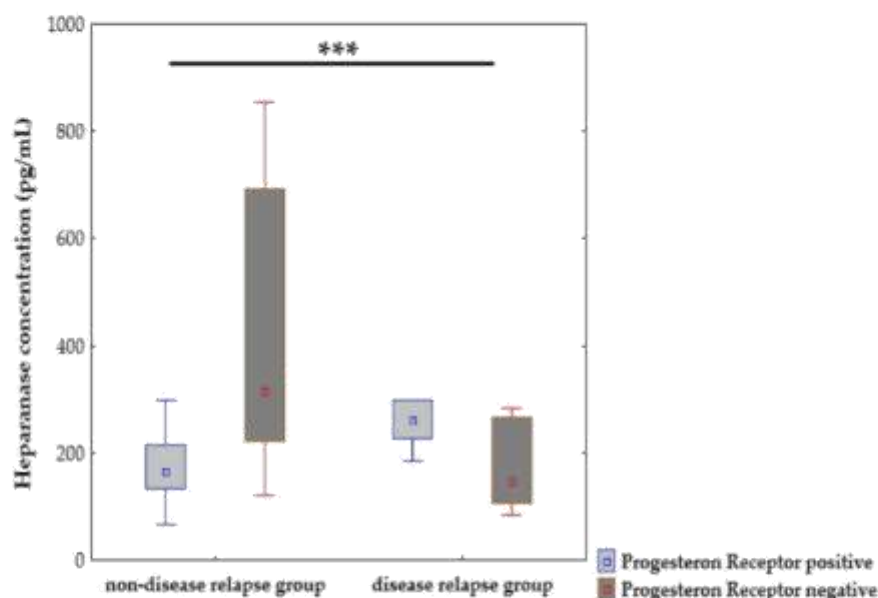


Figure 4. Progression-free survival depending on pre-treatment heparanase concentration and progesterone receptor status; significant difference is denoted by ***.

The last step of the statistical analysis was to determine the factors influencing the low or high pre-treatment concentration of heparanase (Table 5) and the low or high numerical decrease in heparanase concentration after completion of adjuvant treatment (Table 6) using the univariate logistic regression.

Table 5. Univariate logistic regression analyses of low or high pre-treatment heparanase concentration predictors in IBrc patients.

Variable Code		Univariable OR (95% CI)	p-Values
Age	<55 years	Reference	1.0000
	≥55 years	1.00 (0.42–2.40)	
Menopausal status	Premenopausal	Reference	0.4788
	Postmenopausal	0.71 (0.28–1.81)	
BMI	≤24.9 kg/m ²	Reference	0.0397
	25–29.9 kg/m ²	0.36 (0.13–1.02)	
	30–39.9 kg/m ²	1.09 (0.32–3.69)	
Expression of HER2	Negative	Reference	0.4605
	Positive	1.76 (0.39–7.93)	
Expression of Ki67	< 15%	Reference	0.1808
	≥ 15%	0.55 (0.22–1.33)	
ER status	Negative	Reference	0.0369
	Positive	5.52 (1.11–27.43)	
PgR status	Negative	Reference	0.0191
	Positive	4.33 (1.27–14.78)	
Molecular subtypes	Luminal A	Reference	0.2404
	Luminal B HER2(-)	1.35 (0.29–6.30)	
	Luminal B HER2(+) or non-Luminal HER2(+)	0.63 (0.20–1.97)	

Table 5. *Cont.*

Variable Code	Univariable		
	OR (95% CI)	p-Values	
	Triple negative	0.23 (0.04–1.23)	0.1011
Tumour diameter	T1 (<2 cm)	Reference	
	T2 (≥2 cm <5 cm)	0.35 (0.13–0.94)	0.0361
Nodal status	N0	Reference	
	N1	1.15 (0.41–3.22)	0.7928
Tumour stage	IA	Reference	
	IIA + IIB	0.49 (0.20–1.20)	0.1193
Tumour grade	G1 + G2	Reference	
	G3	0.73 (0.24–2.20)	0.5769

OR: odd ratio; CI: confidence interval; BMI: body mass index; Ki67: proliferation marker; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; PgR: progesterone receptor.

Table 6. Univariate logistic regression analyses of low or high heparanase changes as predictors in breast cancer patients.

Variable Code	Univariable		
	OR (95% CI)	p-Values	
Age	<55 years	Reference	
	≥55 years	1.22 (0.51–2.94)	0.6549
Menopausal status	Premenopausal	Reference	
	Postmenopausal	0.89 (0.35–2.26)	0.8131
BMI	≤24.9 kg/m ²	Reference	
	25–29.9 kg/m ²	0.53 (0.19–1.45)	0.0683
	30–39.9 kg/m ²	1.80 (0.52–6.27)	0.1344
Expression of HER2	Negative	Reference	
	Positive	1.00 (0.23–4.31)	1.0000
Expression of Ki67	<15%	Reference	
	≥15%	0.44 (0.18–1.09)	0.0753
ER status	Negative	Reference	
	Positive	1.91 (0.51–7.12)	0.3356
PgR status	Negative	Reference	
	Positive	2.15 (0.71–6.53)	0.1771
Molecular subtypes	Luminal A	Reference	
	Luminal B HER2-	0.74 (0.17–3.33)	0.7579
	Luminal B HER2+ or non-Luminal HER2+	0.34 (0.10–1.12)	0.2014
	Triple-negative	0.59 (0.14–2.49)	0.9350
Tumour diameter	T1 (<2 cm)	Reference	
	T2 (≥2 cm <5 cm)	0.89 (0.35–2.26)	0.8131
Nodal status	N0	Reference	
	N1	0.87 (0.31–2.44)	0.7928
Tumour stage	IA	Reference	
	IIA + IIB	0.90 (0.38–2.17)	0.8230

Table 6. Cont.

Variable Code	Univariable		
	OR (95% CI)	p-Values	
Tumour grade	G1 + G2 G3	Reference 1.00 (0.33–2.99)	1.0000
Pre-treatment heparanase concentration (pg/mL)	Continuous	0.97 (0.96–0.98)	<0.0001
Post-treatment heparanase concentration (pg/mL)	Continuous	1.00 (0.99–1.01)	0.7053
Surgery type	BCS Mastectomy	Reference 1.18 (0.38–3.63)	0.7747
Endocrine therapy	No	Reference	
	Tamoxifen	3.47 (0.89–13.48)	0.0313
	Inhibitor aromatase	1.20 (0.25–5.77)	0.6984
	Tamoxifen and inhibitor aromatase	0.80 (0.10–6.10)	0.4027
Chemotherapy	Other	2.00 (0.20–19.91)	0.7070
	No	Reference	
	Anthracycline	1.00 (0.39–2.55)	1.0000
Radiotherapy	Non-anthracycline	1.00 (0.22–4.54)	1.0000
	No	Reference	
	Yes	0.73 (0.24–2.20)	0.5770

OR: odd ratio; CI: confidence interval; BMI: body mass index; Ki67: proliferation marker; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; PgR: progesterone receptor; BCS- Breast-conserving therapy.

On univariate analysis, overweight IBrC subjects and patients with a tumour diameter of ≥ 2 cm demonstrated a lower chance of a lower pre-treatment heparanase concentration ($p = 0.0397$, $p = 0.0361$, respectively). However, patients with a positive ER and PgR status showed a greater chance of having a lower pre-treatment heparanase concentration ($p = 0.0369$; $p = 0.0191$).

Table 6 demonstrates several factors which influence whether the change in pre- and post-treatment concentration of heparanase will be low or high. According to OR 0.97 and 95% CI 0.96–0.98; $p < 0.0001$ we suggest that the pre-treatment heparanase concentration is the main predictor of the changes in heparanase concentration after adjuvant treatment. In the subgroup of patients who received only tamoxifen compared to the subgroup of patients who did not receive any type of endocrine therapy, a small difference between the pre- and post-treatment heparanase levels was observed.

4. Discussion

Adjuvant treatment of IBrC depends not only on the tumour phenotype but also on the menopausal status and co-existing diseases. Thus, a wider perspective and more complex approach to IBrC treatment is crucial to better organising this process. In our study, we examined pre-treatment heparanase concentrations with respect to the adjuvant treatment response and we took efforts to determine the prognostic value of pre- and post-treatment heparanase levels and also numerical and percentage changes in pre- and post-treatment heparanase concentrations. Heparanase demonstrates strong implications for tumour aggressiveness and dissemination [13]. We compared the pre-treatment concentration of heparanase with its levels after surgery and adjuvant treatment. We observed that regardless of treatment pattern heparanase levels were reduced. Zhang et al. observed a significant decrease in serum heparanase concentrations in ovarian cancer patients after

surgery [18]. It is worth mentioning that this observation is not obvious in all cancer types. Since, Ramani et al. observed that in eight of nine myeloma patients; tumour cells surviving chemotherapy had higher heparanase expression with respect to pre-treatment levels. The authors claim that in patients undergoing chemotherapy, NF- κ B is stimulated leading to the upregulation of heparanase [19]. Bhattacharya et al. demonstrated that the activation and polarisation of macrophages induced by chemotherapy is also heparanase-linked, hence the widening of heparanase function in macrophages was noted [13]. Ramani et al. also demonstrated that a higher heparanase expression was associated with chemo-resistant cancer cells [20].

Tumour size, tumour stage, nuclear grade, and metastasis status have been reported to be of prognostic significance for IBrC. In the current study, we noted that the higher pre-treatment heparanase concentration is a good indicator for invasive phenotypes of breast cancer and shorter post-operative survival times. Furthermore, similar findings in respect to PFS were obtained for the numerical changes between first and second blood collection for heparanase. PFS was lower in those patients with a numerical change in heparanase concentration above 137.74 pg/mL.

Additionally, the pre-treatment heparanase concentration is the main predictor of the changes in heparanase concentration after adjuvant treatment. Interestingly, a positive correlation between pre-treatment heparanase levels with post-treatment concentration of heparanase confirms this hypothesis. This provides useful information that heparanase is a potent protein for cancer progression. Similarly, Vornicova et al. noted that high levels of heparanase in stage I breast cancer is linked with a 4.5-fold increased risk of disease recurrence [11]. Hunter et al. noted that heparanase mRNA was expressed at very low levels in normal islets, whereas its expression was increased 40-fold in primary tumours and metastatic tumours. Suppression of heparanase was associated with a significant decrease in tumour invasion [15]. Similarly, in normal breast epithelium, heparanase is undetected, but in breast malignancy, its expression elevates, which is linked with larger tumour size and aggressiveness [21]. Efficient heparanase activity depends on the microenvironment pH, since a pH of approximately 7 leads to inactivation of heparanase, but an acidic pH of between 5 and 6 provides its optimal activity during tumour growth and in pro-inflammatory conditions [22]. Zhang et al. established that either serum heparanase concentration or its expression at mRNA or/and protein levels indicate prognostic and diagnosis values in ovarian cancer [18]. Thus, overexpression of heparanase correlates positively with the invasion and spread of cancer cells as well as inflammation, procoagulant state and neovessel formation within the tumour. Since, heparanase is the only enzyme that degrades heparan sulphate, the main component of the ECM [14].

According to the univariate logistic regression analysis, we observed a lower chance of low pre-treatment heparanase levels in the overweight IBrC subjects compared to their normal-weight counterparts. Accumulation of adipose tissue is a well-known risk factor for hormone-dependent cancers. Interestingly, overweight/obesity in postmenopausal women is associated with increased susceptibility to luminal breast cancers, but premenopausal overweight/obese women are more predisposed to developing triple-negative cancer. Thus, adiposity is linked to more aggressive breast cancer behaviours, including more advanced tumour stage and poor survival [23,24]. Hyperinsulinemia is a causal link between adiposity and breast cancer development. Goldberg et al. demonstrated a strong interaction between heparanase and insulin signalling, which may support breast tumorigenesis. Since heparanase exerts properties to enhance insulin-induced proliferation in breast carcinoma cells in vitro, authors have reported a relevant association between lymph node metastases and the simultaneous existence of both hyperglycaemia and heparanase expression [25]. Thus, the reduced chance of having a lower pre-treatment concentration of heparanase in overweight IBrC cases most likely indicates worse future outcomes.

Analysing the heparanase concentration depending on the presence of oestrogen and progesterone receptors demonstrates higher pre- and post-treatment heparanase concentrations among ER(-) and PgR(-) patients compared to ER(+) and PgR(+) counterparts.

The PFS rate was lower in PgR negative cases since the number of patients in this group was only 17 (PFS = 70.6%), while there were 63 patients with PgR positive expression, thus the PFS was 90.5% (Table S1). Additionally, according to univariate logistic regression, a tumour diameter larger than 2 cm, and the lack of ER and PgR expression were strong influences on high pre-treatment heparanase in IBrC patients. Our findings are in line with Imada et al.'s study, since the authors observed that the immunohistochemical identification of heparanase in breast cancer biopsy specimens was linked with a larger primary tumour size and tumour spread [26]. Tang et al. also observed that heparanase expression was positively connected with a larger size of breast cancer tumour, higher clinical stage, and lymph node metastasis [27,28]. Negative hormone receptor status with a higher concentration of heparanase is associated with a more aggressive nature of IBrC and a worse prognosis since the ER/PR negative subtypes of IBrC include a non-luminal HER2+ and a triple-negative molecular subtype. Both of these confer more aggressive character and clinical behaviour. These tumours present higher histological and nuclear grades are highly proliferative and show poor tubule creation [29]. Thus, overexpression of heparanase leads to a loss of extracellular matrix integrity, enabling invasion, and the dissemination of cancer cells. Moreover, most likely higher post-treatment heparanase concentrations in ER/PR negative cancers was associated with chemo-resistant cancer cells and most likely with treatment failure [20]. However, Cohen et al. observed a three-fold incidence in the frequency of heparanase overexpression in ER-positive breast cancer with respect to the ER-negative ones. The authors claim that the ER-dependent heparanase regulation mechanism works *in vivo*, but the 15% occurrence of heparanase expression in ER-negative tumours suggests distinct molecular mechanisms are accountable for the increase in heparanase expression in the subgroup of ER-negative breast cancers [30]. Interestingly, according to our further analysis we observed that patients with a positive PgR expression who developed a disease relapse showed a higher pre-treatment concentration of heparanase than in the patients without a disease relapse. However, among patients with a negative expression of PgR, disease recurrence occurred in those with a lower pre-treatment concentration of heparanase. This may indicate that a high pre-treatment concentration of heparanase may be a negative prognostic factor, thus other cancer-related factors should be taken into account. Undoubtedly, further studies are needed in this field (Figure 4).

Finally, a higher post-treatment concentration of heparanase was found in patients with a triple-negative tumour compared to patients with a luminal B HER2 negative type of IBrC. According to our study (Table S1), regardless of tumour stage, triple-negative tumours (PFS = 67%) demonstrated more aggressive biological behaviour than tumours expressing HER2 (PFS = 100%). It is well-established that the triple-negative subtype of IBrC is identified by invasiveness and poor prognosis. The study of Yang et al. is in line with our findings that the expression of heparanase was significantly higher in the metastatic group with respect to their non-metastatic counterparts and a high expression of heparanase was also significantly linked with poor disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in triple-negative subjects. The authors have claimed that heparanase enhanced the blood and oxygen delivery of both the breast tumours and lung metastases through a new vessel network and vascular mimicry, thus leading to tumour growth and malignant progression [31].

Higher levels of heparanase may be provoked locally by its secretion from platelets, neutrophils, and mast cells [14]. Interestingly, tamoxifen can suppress tumour cell-induced platelet activation leading to a diminishing of the pro-angiogenic and pro-metastatic potential of platelets. A possible mechanism, by which this phenomenon may be explained, is based on platelets expressing oestrogen receptors α and β on their surface, but there are doubts whether tamoxifen influences platelets via these receptors, since tamoxifen is a selective oestrogen receptor agent that is generally used as anti-oestrogen therapy for breast cancer [32]. Our speculations related to reducing the release of heparanase from platelets by tamoxifen were based on Johnson's study who noted that tamoxifen reduces the release

of VEGF. The author suggests that tamoxifen ameliorates breast cancer survival rates by reducing the pro-angiogenic action of platelets [32]. Moreover, we observed that patients who received only tamoxifen had a smaller difference between the pre- and post-treatment heparanase levels than patients who did not receive any type of endocrine therapy. This could be due to two main reasons. Firstly, there is a link with the differences between the subgroups in pre-treatment heparanase concentrations, since the patients who did not receive endocrine therapy demonstrated negative oestrogen and progesterone receptor status as well as the highest pre-treatment heparanase level. However, with respect to pre-treatment concentrations of heparanase, the opposite dependencies were observed in the subgroup which was only given tamoxifen. Secondly, according to the analysis of the influence of an endocrine therapy scheme on the post-treatment heparanase concentration, the lowest heparanase concentrations were observed in patients who were first treated with tamoxifen and then with aromatase inhibitors. This may indicate the smaller effect of tamoxifen as a single agent on the reduction in heparanase concentration, and perhaps, therefore, in those subjects, we more often observed a low difference between pre- and post-treatment heparanase concentrations. Ekin et al. noted that oestrogen treatment stimulates heparanase gene transcription in oestrogen receptor-positive breast cancer cells in an in vitro study, leading to the development and progression of breast cancer [33]. Cohen et al. reported that tamoxifen demonstrates an oestrogen-like stimulatory impact on heparanase expression in two ER-positive breast carcinoma cell lines. The authors claim that most of the patients whose tumours were characterised by higher levels of heparanase were treated with tamoxifen [30].

Limitations of the Study

One of the strengths of our study was its prospective nature, and also that the associations between the analysed factors and future outcomes were studied in a well-characterised study cohort and a long-term follow-up (median follow-up 55 months; IQR 49–59 months). The strength of this study was the incorporation of detailed clinicopathological data and wide ranges of potential prognostic indicators, which may have contributed to the favourable results. Some limitations of our study should be acknowledged. It was a single-centre study. The modest sample size precluded subgroup analyses (e.g., cancer histology types), limited multivariable analyses, and a limited assessment of confounding and interactions. The study population was fully Caucasian, limiting race/ethnicity association evaluations. Thus, these preliminary results need to be confirmed by a study on a large scale as well as by the functional analysis of heparanase through in vitro studies in the future to ensure the generalizability of our data. All in all, these limitations do not decrease the importance of our findings which can be easily implemented into clinical practice.

5. Conclusions

In conclusion, our findings indicate several relevant issues: (1) According to the expectations, IBrC therapy reduced the heparanase levels, regardless of treatment patterns; (2) Pre-treatment heparanase concentration is associated with the future outcomes of IBrC patients, since a concentration of heparanase higher than 181.46 pg/mL has been shown to promote the probability of recurrence and morbi-mortality in the IBrC cohort; (3) Interestingly, higher pre-treatment concentration of heparanase depends on tumour size (≥ 2 cm) and lack of ER and PgR expression; confirming its association with a more aggressiveness phenotype of the IBrC. Nevertheless, future studies should confirm the application of our cut-off point for the pre-treatment concentration of heparanase.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm10102184/s1>. Table S1: Informative profile of IBrC patients in respect to disease relapse.

Author Contributions: Conceptualization, K.B., B.R.-C., P.R.; methodology, K.B., B.R.-C.; software, K.B.; validation, K.B., B.R.-C.; formal analysis, K.B.; investigation, K.B., E.Z., B.R.-C.; resources, K.B., P.R.; data curation, B.R.-C., E.Z.; writing—original draft, K.B., B.R.-C.; writing—review &

editing, B.R.-C.; visualization, K.B.; supervision, B.R.-C.; project administration, B.R.-C., E.Z.; funding acquisition, K.B., P.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Institutional Review Board Statement: This study was undertaken in accordance with the Declaration of Helsinki, following the guidelines and approval of the local Ethics Committee (permission number: KB 547/2015). Informed consent was obtained from all participants included in the study.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this article and supplementary material.

Acknowledgments: We would like to thank all of the patients for participating in our study. Many thanks to the biomedical laboratory scientists Barbara Góralczyk, Małgorzata Michalska for their contribution in samples preparation and laboratory assistance.

Conflicts of Interest: The authors have declared that no competing interests exist.

References

- Breast cancer epidemiology, World Health Organization. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (accessed on 15 November 2020).
- DeSantis, C.E.; Ma, J.; Gaudet, M.M.; Newman, L.A.; Mph, K.D.M.; Sauer, A.G.; Jemal, A.; Siegel, R.L. Breast cancer statistics 2019. *CA A Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 438–451. [CrossRef] [PubMed]
- Modi, N.D.; Soric, M.J.; Rowland, A.; Logan, J.M.; McKinnon, R.A.; Kichenadasse, G.; Wiese, M.D.; Hopkins, A.M. A literature review of treatment-specific clinical prediction models in patients with breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2020**, *148*, 102908. [CrossRef] [PubMed]
- Gomes, A.M.; Stelling, M.P.; Pavao, M.S. Heparan sulfate and heparanase as modulators of breast cancer progression. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 852093. [CrossRef] [PubMed]
- Palumbo, R.; Sottotetti, F.; Quaquerini, E.; Gambaro, A.; Ferzi, A.; Tagliaferri, B.; Teragni, C.; Licata, L.; Serra, F.; Lapidari, P.; et al. Patterns of treatment and outcome with 500-mg fulvestrant in postmenopausal women with hormone receptor-positive/HER2-negative metastatic breast cancer: A real-life multicenter Italian experience. *Ther. Adv. Med Oncol.* **2019**, *11*, 1758835919833864. [CrossRef] [PubMed]
- Menendez, J.A.; Mehmi, I.; Papadimitropoulou, A.; Vander Steen, T.; Cuyàs, E.; Verdura, S.; Espinoza, I.; Vellon, L.; Atlas, E.; Lupu, R. Fatty acid synthase is a key enabler for endocrine resistance in heregulin-overexpressing luminal B-like breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7661. [CrossRef]
- Gourgue, F.; Mignon, L.; Van Hul, M.; Dehaen, N.; Bastien, E.; Payen, V.; Leroy, B.; Joudiou, N.; Vertommen, D.; Bouzin, C.; et al. Obesity and triple-negative-breast-cancer: Is apelin a new key target? *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 10233–10244. [CrossRef]
- Gouri, A.; Dekaken, A.; El Bairi, K.; Aissaoui, A.; Laabed, N.; Chefrou, M.; Ciccolini, J.; Milano, G.; Benharkat, S. Plasminogen activator system and breast cancer: Potential role in therapy decision making and precision medicine. *Biomark. Insights* **2016**, *11*, 105–111. [CrossRef]
- Mohan, C.D.; Hari, S.; Preetham, H.D.; Rangappa, S.; Barash, U.; Ilan, N.; Nayak, S.C.; Gupta, V.K.; Basappa; Vlodavsky, I.; et al. Targeting heparanase in cancer: Inhibition by synthetic, chemically modified, and natural compounds. *iScience* **2019**, *15*, 360–390. [CrossRef] [PubMed]
- Tripathi, K.; Ramani, V.C.; Bandari, S.K.; Amin, R.; Brown, E.E.; Ritchie, J.P.; Stewart, M.D.; Sanderson, R.D. Heparanase promotes myeloma stemness and in vivo tumorigenesis. *Matrix Biol.* **2020**, *88*, 53–68. [CrossRef]
- Vornicova, O.; Naroditsky, I.; Boyango, I.; Shachar, S.S.; Mashiach, T.; Ilan, N.; Vlodavsky, I.; Bar-Sela, G. Prognostic significance of heparanase expression in primary and metastatic breast carcinoma. *Oncotarget* **2017**, *9*, 6238–6244. [CrossRef]
- Coombe, D.R.; Gandhi, N.S. Heparanase: A challenging cancer drug target. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1316. [CrossRef]
- Bhattacharya, U.; Gutter-Kapon, L.; Kan, T.; Boyango, I.; Barash, U.; Yang, S.M.; Liu, J.; Gross-Cohen, M.; Sanderson, R.D.; Shaked, Y.; et al. Heparanase and chemotherapy synergize to drive macrophage activation and enhance tumor growth. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 57–68. [CrossRef]
- Nadir, Y.; Brenner, B. Heparanase multiple effects in cancer. *Thromb. Res.* **2014**, *133* (Suppl. 2), S90–S94. [CrossRef]
- Hunter, K.E.; Palermo, C.; Kester, J.C.; Simpson, K.; Li, J.P.; Tang, L.H.; Klimstra, D.S.; Vlodavsky, I.; Joyce, J.A. Heparanase promotes lymphangiogenesis and tumor invasion in pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncogene* **2014**, *33*, 1799–1808. [CrossRef]
- Bielawski, K.; Rhone, P.; Bielawska, S.; Rośc, D.; Brkic, A.; Zarychta, E.; Ruszkowska-Ciastek, B. Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate. *J. Physiol. Pharmacol.* **2019**, *70*, 455–466. [CrossRef]

17. Hammond, M.E.; Hayes, D.F.; Dowsett, M.; Allred, D.C.; Hagerty, K.L.; Badve, S.; Fitzgibbons, P.L.; Francis, G.; Goldstein, N.S.; Hayes, M.; et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2010**, *134*, e48–e72. [[CrossRef](#)]
18. Zhang, W.; Chan, H.; Wei, L.; Pan, Z.; Zhang, J.; Li, L. Overexpression of heparanase in ovarian cancer and its clinical significance. *Oncol. Rep.* **2013**, *30*, 2279–2287. [[CrossRef](#)]
19. Ramani, V.C.; Vlodavsky, I.; Ng, M.; Zhang, Y.; Barbieri, P.; Nosedà, A.; Sanderson, R.D. Chemotherapy induces expression and release of heparanase leading to changes associated with an aggressive tumor phenotype. *Matrix Biol.* **2016**, *55*, 22–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ramani, V.C.; Zhan, F.; He, J.; Barbieri, P.; Nosedà, A.; Tricot, G.; Sanderson, R.D. Targeting heparanase overcomes chemoresistance and diminishes relapse in myeloma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 1598–1607. [[CrossRef](#)]
21. Sun, X.; Zhang, G.; Nian, J.; Yu, M.; Chen, S.; Zhang, Y.; Yang, G.; Yang, L.; Cheng, P.; Yan, C.; et al. Elevated heparanase expression is associated with poor prognosis in breast cancer: A study based on systematic review and TCGA data. *Oncotarget* **2017**, *8*, 43521–43535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rivara, S.; Milazzo, F.M.; Giannini, G. Heparanase: A rainbow pharmacological target associated to multiple pathologies including rare diseases. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 647–680. [[CrossRef](#)]
23. Picon-Ruiz, M.; Morata-Tarifa, C.; Valle-Goffin, J.J.; Friedman, E.R.; Slingerland, J.M. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin.* **2017**, *67*, 378–397. [[CrossRef](#)]
24. Ray, A. Cancer and comorbidity: The role of leptin in breast cancer and associated pathologies. *World J. Clin. Cases* **2018**, *6*, 483–492. [[CrossRef](#)]
25. Goldberg, R.; Sonnenblick, A.; Hermano, E.; Hamburger, T.; Meirovitz, A.; Peretz, T.; Elkin, M. Heparanase augments insulin receptor signaling in breast carcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 19403–19412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Imada, T.; Matsuoka, J.; Nobuhisa, T.; Okawa, T.; Murata, T.; Tabuchi, Y.; Shirakawa, Y.; Ohara, N.; Gunduz, M.; Nagatsuka, H.; et al. COX-2 induction by heparanase in the progression of breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* **2006**, *17*, 221–228. [[CrossRef](#)]
27. Tang, D.; Piao, Y.; Zhao, S.; Mu, X.; Li, S.; Ma, W.; Song, Y.; Wang, J.; Zhao, W.; Zhang, Q. Expression and correlation of matrix metalloproteinase-9 and heparanase in patients with breast cancer. *Med. Oncol.* **2014**, *31*, 26. [[CrossRef](#)]
28. Tang, D.; Zhang, Q.; Zhao, S.; Wang, J.; Lu, K.; Song, Y.; Zhao, L.; Kang, X.; Wang, J.; Xu, S.; et al. The expression and clinical significance of microRNA-1258 and heparanase in human breast cancer. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 926–932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Yersal, O.; Barutca, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* **2014**, *5*, 412–424. [[CrossRef](#)]
30. Cohen, I.; Maly, B.; Simon, I.; Meirovitz, A.; Pikarsky, E.; Zcharia, E.; Peretz, T.; Vlodavsky, I.; Elkin, M. Tamoxifen induces heparanase expression in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4069–4077. [[CrossRef](#)]
31. Yang, W.J.; Zhang, G.L.; Cao, K.X.; Liu, X.N.; Wang, X.M.; Yu, M.W.; Li, J.P.; Yang, G.W. Heparanase from triple-negative breast cancer and platelets acts as an enhancer of metastasis. *Int. J. Oncol.* **2020**, *57*, 890–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Johnson, K.E.; Forward, J.A.; Tippy, M.D.; Ceglowski, J.R.; El-Husayni, S.; Kulenthirarajan, R.; Machlus, K.R.; Mayer, E.L.; Italiano, J.E., Jr.; Battinelli, E.M. Tamoxifen directly inhibits platelet angiogenic potential and platelet-mediated metastasis. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, 664–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Elkin, M.; Cohen, I.; Zcharia, E.; Orgel, A.; Guatta-Rangini, Z.; Peretz, T.; Vlodavsky, I.; Kleinman, H.K. Regulation of heparanase gene expression by estrogen in breast cancer. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 8821–8826. [[PubMed](#)]

IV. PODSUMOWANIE

Aktualne prognozy i statystyki wskazują na światowy trend wzrostu zarówno zachorowalności na raka piersi, jak i związanej z nim śmiertelności. Pomimo dostępności wielu opcji terapeutycznych w 2020 r. na całym świecie odnotowano ok. 685 tys. zgonów z powodu raka piersi. Ze względu na niekorzystny trend oraz dużą heterogeniczność w zakresie podtypów i biologii raka piersi cały czas poszukiwane są nowe terapie oraz nowe markery prognostyczne, które pozwoliłyby na możliwie największe zmniejszenie ilości nawrotów oraz zgonów związanych z chorobą nowotworową.

W kontekście odwrócenia światowego trendu wzrostu zachorowalności i śmiertelności z powodu raka piersi kluczowe znaczenie mają kwestie społeczno-ekonomiczne takie jak dostęp do nowoczesnych terapii czy metod diagnostycznych. Z tego względu od nowych markerów prognostycznych oczekuje się oprócz wysokich wartości predykcyjnych również dużej dostępności zarówno pod względem finansowym jak i technologicznym.

Do głównych przyczyn śmierci z powodu raka piersi należą przerzuty choroby pierwotnej do narządów odległych oraz powikłania zakrzepowo-zatorowe tj. zatorowość płucna. Procesy te wydają się być silnie powiązane ze zmianami zachodzącymi w obrębie mikrośrodowiska nowotworu i dotyczą zmian prozapalnych, proangiogennych, prozakrzepowych oraz przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej. Procesy te są ze sobą silnie powiązane i mogą wzajemnie promować rozwój choroby nowotworowej.

W ostatnich latach obserwujemy gwałtowny globalny wzrost liczby osób z nadwagą i otyłością. Ma to kluczowe znaczenie również w kontekście zachorowalności i śmiertelności z powodu raka piersi ponieważ tkanka tłuszczowa stanowi ważny organ endokryny. W przypadku nadwagi i otyłości obserwujemy deregulację w zakresie wydzielanych hormonów oraz cytokin, która prowadzi do powstania ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Natomiast stan zapalny może być czynnikiem inicjującym całą kaskadę zdarzeń promujących powstawanie i rozwój nowotworu.

Naturalnymi atrybutami komórek nowotworowych są również niekontrolowana proliferacja, oporność na apoptozę, zwiększony potencjał angiogeny oraz zdolność do migracji. Natomiast jednym z pierwszych etapów umożliwiających rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych i powstawanie przerzutów jest degradacja połączeń pomiędzy komórkami oraz pomiędzy komórkami a ECM w pierwotnym miejscu guza. Zarówno

aktywność enzymatyczna jak i nieenzymatyczna heparanazy prowadzi do zmniejszenia integralności macierzy zewnątrzkomórkowej.

Wysokie stężenie heparanazy przed leczeniem zwiększa prawdopodobieństwo nawrotu i śmierci z powodu choroby nowotworowej. Kluczowe znaczenie w progresji raka piersi mogą mieć wzajemne interakcje pomiędzy heparanazą a waskulogenezą i angiogenezą. Wysokie stężenie heparanazy może prowadzić do zwiększonego uwalniania VEGF oraz w ten sposób może również prowadzić do zwiększonej mobilizacji krążących EPCs. Dodatkowo wyższe stężenia heparanazy występują w przypadku wielkości guza ≥ 2 cm (T2) oraz przy braku ekspresji ER i PR co potwierdza jej skojarzenie z bardziej agresywnym fenotypem raka piersi.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że stężenie YKL-40 oraz aktywność TF mogą służyć jako indywidualne markery bardziej agresywnego charakteru komórek nowotworowych i krótszego czasu przeżycia pacjentek z rakiem piersi. Dodatkowo wykazano, że połączenie wysokiego początkowego stężenia YKL-40 i leptyny w surowicy przy prawidłowym BMI oraz połączenie prawidłowego BMI z niskim stężeniem adiponektyny wiąże się ze złym rokowaniem. Wskazuje to,

Wykazano także, że leczenie raka piersi obniża stężenie heparanazy, niezależnie od zastosowanego schematu leczenia. Może to wskazywać na brak oporności komórek nowotworowych na zastosowaną terapię. Stwierdzono także, że stężenie heparanazy po leczeniu nie wykazuje funkcji prognostycznej w przewidywaniu nawrotu choroby oraz zależy przede wszystkim od stężenia heparanazy przed leczeniem.

V. WNIOSKI

Publikacja nr 1

Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate.

- związek wysokiego stężenia heparanazy z nasiloną waskulogenezą i angiogenezą ma kluczowe znaczenie w progresji raka piersi ponieważ wysokie stężenie heparanazy może prowadzić do zwiększonej mobilizacji krążących EPCs m.in. poprzez zwiększone uwalnianie VEGF;
- stężenie przed leczeniem heparanazy może przewidywać nawrót choroby - analiza krzywej ROC oraz indeksu Yudena wykazała, że stężenie heparanazy wynoszące 213,74 pg/ml (w osoczu) może służyć jako wartość odróżniająca pacjentów, u których wystąpi lub nie wystąpi nawrót choroby;
- wysokie stężenie heparanazy obok wielkości guza oraz ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych może służyć jako wskaźnik bardziej agresywnego charakteru komórek nowotworowych i krótszego czasu przeżycia pacjentek z rakiem piersi.

Publikacja nr 2

Pre-operative combination of normal BMI with elevated YKL-40 and leptin but lower adiponectin level is linked to a higher risk of breast cancer relapse: a report of four-year follow-up study.

- połączenie wysokiego początkowego stężenia YKL-40 i leptyny w surowicy przy prawidłowym BMI oraz połączenie prawidłowego BMI z niskim stężeniem adiponektyny wiąże się ze złym rokowaniem;
- pojedyncze wysokie stężenie YKL-40 i pojedyncza wysoka aktywność TF były istotnie związane z gorszym rokowaniem wśród pacjentek z rakiem piersi w czteroletniej obserwacji;
- pacjentki z rakiem piersi z nadwagą mają lepsze rokowanie niezależnie od stężenia YKL-40, leptyny i adiponektyny co sugeruje, że umiarkowanie zwiększony BMI może pozytywnie wpływać na przeżycie bez nawrotu choroby oraz odpowiedź na zastosowaną terapię

- dalsze badania wyjaśniające mechanizmy dotyczące tkanki tłuszczowej, a w szczególności adipokin i cytokin przez nią wytwarzanych, mogą pomóc w zrozumieniu i zapobieganiu poważnym skutkom raka piersi wśród pacjentek z prawidłową masą ciała.

Publikacja nr 3

Impact of adjuvant treatment on heparanase concentration in invasive, unilateral breast cancer patients: results of a prospective single-centre cohort study.

- leczenie inwazyjnego raka piersi wiązało się z obniżeniem stężenia heparanazy, niezależnie od zastosowanego modelu terapii co może wskazywać na brak oporności komórek nowotworowych na zastosowane leczenie;
- stężenie heparanazy przed leczeniem jest związane z przyszłymi wynikami pacjentów z inwazyjnym rakiem piersi - wykazano, że stężenie heparanazy wyższe niż 181,46 pg/ml zwiększa prawdopodobieństwo nawrotu choroby nowotworowej oraz śmiertelności z powodu inwazyjnego raka piersi;
- stężenie heparanazy po leczeniu nie wykazuje wartości prognostycznej i zależy przede wszystkim od stężenia heparanazy przed leczeniem;
- wyższe stężenie heparanazy przed leczeniem zależy od wielkości guza (≥ 2 cm) oraz braku ekspresji ER i PR co potwierdza jego związek z bardziej agresywnym fenotypem inwazyjnego raka piersi;
- przyszłe badania powinny potwierdzić zastosowanie użytego w tym badaniu punktu odcięcia dla stężenia heparanazy przed leczeniem.

VI. STRESZCZENIA

Streszczenie w języku polskim

CEL: Celem pracy była ocena stężeń heparanazy, wybranych markerów angiogenezy (VEGF-A, sVEGFR1, sVEGFR2), liczby krążących komórek progenitorowych śródbłonka o immunofenotypie CD45-/CD34+/CD31+/CD133+, hormonów wydzielanych przez tkankę tłuszczową (adiponektyna, leptyna), markera stanu zapalnego- białka YKL-40 oraz ocena aktywności czynnika tkankowego (TF) w grupie pacjentek z pierwotnym, jednostronnym nowotworem piersi bez przerzutów odległych. Ponadto określono zależności pomiędzy tymi parametrami a wybranymi wskaźnikami antropometrycznymi oraz kliniczno-patologicznymi takimi jak: klasyfikacja kliniczna TNM, ocena stopnia złośliwości histologicznej, podtyp molekularny nowotworu piersi, średnica guza i ekspresja markera proliferacji Ki67. Oceniono także wpływ zastosowanego leczenia chirurgicznego oraz standardowych terapii uzupełniających na zmianę stężenia heparanazy. Dodatkowym celem badania była próba określenia wartości prognostycznej analizowanych parametrów w przewidywaniu nawrotu choroby nowotworowej.

MATERIAŁ I METODY: W publikacji numer 1 badaniem objęto 86 kobiet w wieku od 40 do 71 lat (mediana 55 lat) z nowo zdiagnozowanym jednostronnym nowotworem piersi w stopniu zaawansowania IA-IIB (bez przerzutów odległych). W grupie badanej najczęściej występującym typem molekularnym nowotworu piersi był typ luminalny A (58% pacjentek). W ramach badania oceniano stężenia: heparanazy, naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF-A), rozpuszczalnych form receptora 1 i receptora 2 dla VEGF (odpowiednio sVEGFR1 i sVEGFR2) oraz liczbę krążących komórek progenitorowych śródbłonka o immunofenotypie CD45-/CD34+/CD31+/CD133+. W publikacji numer 2 badaniem objęto 81 pacjentek z rozpoznaniem jednostronnym inwazyjnym nowotworem piersi w stopniu zaawansowania IA-IIB, których mediana wieku wynosiła 54 lata (Q1/Q3 – 49/59 lat). Pod względem rodzaju histologicznego najczęściej występującym nowotworem piersi był inwazyjny rak przewodowy (IDC) (69 pacjentek). W grupie badanej mediana średnicy guza wynosiła 1,67 cm (Q1/Q3 – 1,2/2,1 cm). Natomiast brak zajęcia węzłów chłonnych występował u 62 pacjentek. W ramach badania oceniano stężenie adiponektyny, leptyny i białka YKL-40 oraz oznaczono aktywność czynnika tkankowego (TF). W publikacji 3 badaniem zostało objętych 80 pacjentek z potwierdzonym operacyjnym, pierwotnym i jednostronnym nowotworem piersi bez przerzutów odległych: 53 pacjentki po menopauzie (66%) oraz 27

pacjentek przed menopauzą (34%). Mediana czasu obserwacji wynosiła 55 miesięcy (Q1/Q3 – 49/59 miesięcy). Najczęściej obserwowanym typem molekularnym nowotworu piersi był typ luminalny A (59% grupy badanej). Ponadto w grupie badanej zaobserwowano następujące występowanie wybranych cech kliniczno-patologicznych: wielkość guza < 2cm u 53 pacjentek (66%) oraz brak zajęcia węzłów chłonnych u 61 pacjentek (76%). Większość grupy badanej, 65 pacjentek (81%) zostało poddanych leczeniu oszczędzającemu pierś. Natomiast w ramach terapii adjuwantowej chemioterapię zastosowano u 38 badanych (47,5%), a leczenie hormonalne u 68 pacjentek (85%). W całej grupie badanej dwukrotnie oznaczono stężenie heparanazy: dzień przed zabiegiem chirurgicznym oraz po ok. 8 miesiącach od operacji (Q1/Q3 – 6,2/10,7).

WYNIKI: W wyniku przeprowadzonych analiz statystycznych **w pierwszej publikacji** w zależności od statusu receptora estrogenowego (ER) oraz progesteronowego (PR) odnotowano istotnie wyższe stężenie heparanazy wśród pacjentek z ujemnym statusem ER i PR receptorów w porównaniu do pacjentek z dodatnim statusem tego receptora. Zaobserwowano istotnie wyższe stężenie heparanazy w podgrupie pacjentek z guzami T2 w porównaniu do podgrupy pacjentek z guzami T1. W zależności od niskiego, średniego i wysokiego stężenia heparanazy odnotowano wzrost stężenia krążących EPCs oraz wzrost stężenia sVEGFR2 wraz ze wzrostem stężenia heparanazy. Dodatkowo wraz ze wzrostem stężenia heparanazy odnotowano spadek potencjału antyangiogennego wyrażonego przez stosunek sVEGFR1/VEGF-A oraz wykazano wzrost wartości stosunku sVEGFR2/sVEGFR1. Analiza krzywych ROC wykazała, że stężenia heparanazy oraz sVEGFR1 mogą być przydatne do oszacowania wystąpienia nawrotu choroby nowotworowej. Natomiast analiza krzywej ROC stworzonej dla modelu uwzględniającego stężenia heparanazy, krążących EPCs, VEGF-A, sVEGFR1 oraz sVEGFR2 wskazuje na silny potencjał diagnostyczny tego modelu do przewidywania nawrotu choroby nowotworowej. Analiza regresji Cox'a wykazała, że w analizowanym modelu najistotniejszymi predyktorami nawrotu choroby nowotworowej są stężenia VEGF-A oraz sVEGFR2. Na podstawie krzywych przeżycia Kaplana-Meiera odnotowano znacznie większą częstość nawrotu choroby u pacjentek z wysokim stężeniem heparanazy wynoszącym > 200 pg/ml w porównaniu do podgrup z niskimi i średnimi stężeniami heparanazy. **W drugiej publikacji** odnotowano niższe stężenie adiponektyny wśród pacjentek z ekspresją markera proliferacji komórkowej Ki67 \geq 20% w porównaniu do grupy z ekspresją poniżej 20%. Dodatkowo stwierdzono wyższe stężenie adiponektyny w przypadku

występowania podtypu luminalnego A w porównaniu do podtypu potrójnie ujemnego. Aktywność czynnika tkankowego również różniła się w zależności od podtypu molekularnego i była najwyższa w podgrupie z nowotworem piersi luminalnym B HER2(+). Na podstawie krzywych przeżycia Kaplana-Meiera odnotowano znacznie większą częstość nawrotu choroby w grupie pacjentek z wysokim stężeniem YKL-40 wynoszącym $> 2,50$ ng/ml oraz wśród pacjentek z wysoką aktywnością TF wynoszącą > 24 pM w porównaniu do podgrup z niskimi i średnimi wartościami tych parametrów. Stwierdzono krótszy czas przeżycia bez nawrotu choroby w grupie pacjentek z BMI < 25 kg/m² w porównaniu do grupy pacjentek, których BMI wynosiło 25-30 kg/m². Ponadto u pacjentek z wysokim stężeniem leptyny $> 12,58$ ng/ml wykazano istotnie większą częstość nawrotów choroby. Podobną zależność stwierdzono również wśród pacjentek z niskim stężeniem adiponektyny $< 27,05$ ng/ml. **W trzeciej publikacji** wykazano prawie czterokrotne obniżenie stężenia heparanazy w całej grupie badanej w wyniku zastosowania leczenia adjuwantowego. Wykazano, że stężenia heparanazy przed i po leczeniu różnią się w zależności od rodzaju zastosowanej terapii hormonalnej. Wyniki analizy przeżycia uzyskane w ramach 3 badania potwierdziły wyniki uzyskane w 1 badaniu. Większą częstość nawrotów choroby zaobserwowano w grupie pacjentów z wysokim (>181 pg/ml) stężeniem heparanazy przed leczeniem. W analizie jednoczynnikowej pacjenci z nadwagą i pacjenci z guzami T2 wykazywali mniejszą szansę na niskie stężenie heparanazy przed leczeniem. Natomiast pacjenci z dodatnim statusem ER i PR wykazywali większą szansę na niskie stężenie początkowe heparanazy.

WNIOSKI: W ramach przeprowadzonych badań uzyskano wyniki potwierdzające związek wysokiego stężenia heparanazy z nasiloną waskulogenezą i angiogenezą. Wysokie stężenie heparanazy może prowadzić do zwiększonej mobilizacji krążących EPCs m.in. poprzez zwiększone uwalnianie VEGF. Dodatkowo wykazano obniżenie stężenia heparanazy niezależnie od zastosowanego modelu terapii. Stwierdzono również, że wysokie stężenie heparanazy, wysokie stężenie YKL-40 i wysoka aktywność TF przed rozpoczęciem leczenia są niezależnymi negatywnymi czynnikami prognostycznymi i wiążą się z krótszym czasem przeżycia bez nawrotu choroby. Także połączenie wysokiego początkowego stężenia YKL-40 i leptyny w surowicy przy prawidłowym BMI oraz połączenie prawidłowego BMI z niskim stężeniem adiponektyny wiąże się ze złym rokowaniem. Ponadto stwierdzono, że pacjentki z rakiem piersi z nadwagą mają lepsze rokowanie niezależnie od poziomu YKL-40, leptyny i adiponektyny.

Streszczenie w języku angielskim

OBJECTIVE: The aim of the study was to assess levels of heparanase, selected angiogenesis markers (VEGF-A, sVEGFR1, sVEGFR2), number of circulating endothelial progenitor cells with the immunophenotype CD45-/CD34+/CD31+/CD133+, hormones released by the adipose tissue (adiponectin, leptin), inflammatory marker- YKL-40 protein, and the activity of tissue factor (TF) in a group of patients with primary, unilateral breast cancer with no distant metastases. Additionally, correlations between these parameters and selected anthropometric and clinical-pathological features, including: TNM classification, assessment of histological grade, breast cancer molecular subtype, tumour diameter and expression of the proliferation marker Ki67 were determined. The influence of surgical procedures and standard adjuvant therapies on change in heparanase levels was also assessed. A final objective of the study was an attempt to determine a prognostic value of the analysed parameters for predicting neoplastic disease relapse.

MATERIAL AND METHODS: In **publication no. 1**, 86 women aged 40 to 71 (median age 55) with newly diagnosed unilateral breast cancer stage IA-IIB (with no distant metastases) were enrolled in the study. In the study group, the most common molecular type of cancer was luminal type A (58% patients). As part of the study, levels of heparanase, vascular endothelial growth factor (VEGF-A), soluble forms of receptor 1 and receptor 2 for VEGF (sVEGFR1 and sVEGFR2), and the number of circulating endothelial progenitor cells with the immunophenotype CD45-/CD34+/CD31+/CD133+ were determined. In **publication no. 2**, 81 women with diagnosed, unilateral, invasive breast cancer grade IA-IIB, median age 54 (Q1/Q3 – 49/59 years) were included in the study. With regard to histological type, the most common breast cancer was invasive duct cancer (IDC) (69 patients). In the study group, the median tumour diameter was 1.67 cm (Q1/Q3 – 1.2/2.1 cm). 62 patients showed no nodal involvement. As part of the study, the levels of adiponectin, leptin and YKL-40 protein, and the activity of tissue factor (TF) were determined. In **publication 3**, 80 patients with confirmed, operable, primary and unilateral breast cancer with no distant metastases were enrolled in the study: 53 postmenopausal patients (66%), and 27 premenopausal patients (34%). Median follow-up was 55 months (Q1/Q3 – 49/59 months). The most commonly observed molecular type of breast cancer was luminal type A (59% of the study group). Moreover, the following incidence of selected clinical-pathological signs was observed in the study group: tumour size

< 2 cm in 53 patients (66%), and no nodal involvement in 61 patients (76%). The majority of the study group, 65 patients (81%) received breast-conserving treatment. And as part of adjuvant therapy, chemotherapy was used in 38 subjects (47.5%), and hormonal treatment in 68 patients (85%). In the whole study group, the heparanase level was determined twice: a day before the surgical procedure, and about 8 months post surgery (Q1/Q3 – 6.2/10.7).

RESULTS: As a result of statistical analyses, **in the first publication**, depending on the status of oestrogen (ER) and progesterone receptors (PR), a significantly higher heparanase level was observed among patients with a negative status of a ER and PR receptors, as compared to patients with a positive status of these receptor. A subgroup of patients with T2 tumours showed significantly higher heparanase level than the subgroup with T1 tumours. Depending on low, medium and high level of heparanase, an increase in the level of circulating EPCs and level of sVEGFR2 was observed, together with an increase in the heparanase level. Additionally, an increase in the heparanase level was associated with a decrease in the anti-angiogenic potential expressed by the sVEGFR1/VEGF-A ratio, and increased levels of the sVEGFR2/sVEGFR1 ratio were observed. The analysis of ROC curves showed that the heparanase and sVEGFR1 levels may be useful in the assessment of the neoplastic disease relapse. And the analysis of the ROC curve created for a model accounting for levels of heparanase, circulating EPCs, VEGF-A, sVEGFR1 and sVEGFR2 shows a strong diagnostic potential of this model in predicting neoplastic disease relapse. Cox regression analysis showed that the most significant predictors of neoplastic disease relapse in the analysed models are VEGF-A and sVEGFR2 levels. The Kaplan-Meier survival curves revealed a much higher rate of disease relapse in patients with high heparanase level of > 200 pg/ml vs subgroups with low and medium heparanase levels. **The second publication** showed lower adiponectin level in patients with expression of cell proliferation marker Ki67 \geq to 20% as compared to the group with expression less than 20%. Additionally, higher adiponectin levels were observed in the case of luminal subtype A versus triple-negative subtype. The activity of tissue factor also differed depending on the molecular subtype, and was the highest in the subgroup with HER2(+) luminal B breast cancer. The Kaplan-Meier survival curves demonstrated a higher rate of disease relapse in patients with high YKL-40 level of > 2.50 ng/ml and in patients with high TF activity > 24 pM vs subgroups with low and medium levels of these parameters. A shorter relapse-free survival was noticed in the group of patients with BMI < 25 kg/m² compared to the group of patients with BMI of 25-30 kg/m². Furthermore,

in patients with high leptin levels > 12.58 ng/ml a significantly higher incidence of disease relapse was revealed. A similar relationship was also found among patients with low adiponectin levels < 27.05 ng/ml. **In the third publication**, almost four times reduction in the heparanase level was observed in the whole study group, resulting from the use of adjuvant treatment. It was shown that heparanase level before and after treatment differed, depending on the type of the hormonal therapy applied. The results of survival analysis obtained in study 3 confirmed the results achieved in study 1. A higher rate of disease relapse was observed in the group of patients with high pre-treatment heparanase level (> 181 pg/ml). In a univariate analysis, patients with overweight and patients with T2 tumours had a lower chance of low pre-treatment heparanase level, while patients with a preoperative positive ER and PR status had a higher chance of low baseline heparanase level.

CONCLUSIONS: In summary, the studies confirm a relationship between high heparanase level with increased vasculogenesis and angiogenesis. A high level of heparanase can lead to high mobilization of circulating EPCs including by increasing the release of VEGF. Additionally, a reduction of the heparanase level regardless of the therapy model applied was demonstrated. It was also observed that high pre-treatment heparanase level, high pre-treatment YKL-40 level and high pre-treatment TF activity are independent negative prognostic factors, and are associated with shorter survival rate. Also high pre-treatment YKL-40 level and serum leptin level combined with normal BMI, as well as normal BMI combined with low adiponectin level was associated with poor prognosis. Moreover, it was observed that patients with breast cancer who are overweight showed a better prognosis, regardless of YKL-40, leptin and adiponectin levels.

VII. BIBLIOGRAFIA

- [1] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet*. 2017;389(10074):1134-1150. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8.
- [2] Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;151:1-32. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.07.002.
- [3] Coughlin SS. Epidemiology of breast cancer in women. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1152:9-29. doi:10.1007/978-3-030-20301-6_2.
- [4] Ahmad A. Breast cancer statistics: recent trends. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1152:1-7. doi:10.1007/978-3-030-20301-6_1.
- [5] Rojas K, Stuckey A. Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016;59(4):651-672. doi: 10.1097/GRF.0000000000000239.
- [6] Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72(2):333-338. doi: 10.1007/s12013-014-0459-6.
- [7] Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*. 2017;50(1):33. doi: 10.1186/s40659-017-0140-9.
- [8] Gupta A, Zhang H, Huang J. The recent research and care of benign breast fibroadenoma: review article. *Yangtze Medicine*. 2019;3:135-141. doi:10.4236/ym.2019.32013.
- [9] Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13(11):1387-1397. doi:10.7150/ijbs.21635.
- [10] Thorat MA, Balasubramanian R. Breast cancer prevention in high-risk women. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2020;65:18-31. doi:10.1016/j.bpobgyn.2019.11.006.
- [11] Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *Lancet*. 2005;365(9472):1727-1741. doi:10.1016/S0140-6736(05)66546-4.
- [12] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. Dostępne na stronie <https://gco.iarc.fr/today> dostęp z dnia 22.12.2021.
- [13] Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowalność i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii. Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 22.12.2021.
- [14] Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):66. doi:10.1038/s41572-019-0111-2.
- [15] Fahad Ullah M. Breast cancer: current perspectives on the disease status. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1152:51-64. doi:10.1007/978-3-030-20301-6_4.

- [16] Kalinowski L, Saunus JM, McCart Reed AE, Lakhani SR. Breast cancer heterogeneity in primary and metastatic disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1152:75-104. doi:10.1007/978-3-030-20301-6_6.
- [17] Cserni G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica.* 2020;112(1):25-41. doi:10.32074/1591-951X-1-20.
- [18] Tsang JYS, Tse GM. Molecular classification of breast cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(1):27-35. doi:10.1097/PAP.000000000000232.
- [19] Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *Oncologist.* 2014;19(8):805-813. doi:10.1634/theoncologist.2014-0108.
- [20] Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(4):290-303. doi: 10.3322/caac.21393.
- [21] Kalli S, Semine A, Cohen S, Naber SP, Makim SS, Bahl M. American Joint Committee on Cancer's staging system for breast cancer, eighth edition: what the radiologist needs to know. *Radiographics.* 2018;38(7):1921-1933. doi:10.1148/rg.2018180056.
- [22] Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):207. doi:10.1186/bcr2607.
- [23] Jassem J, Krzakowski M. Breast cancer. *Oncol Clin Pract.* 2018;14(4):171-215. doi:10.5603/OCP.2018.0027.
- [24] Modi ND, Sorich MJ, Rowland A, Logan JM, McKinnon RA, Kichenadasse G, et al. A literature review of treatment - specific clinical prediction models in patients with breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020;148:102908. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102908.
- [25] DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA A Cancer J Clin.* 2019;69:438-451. doi:10.3322/caac.21583.
- [26] Abu Samaan TM, Samec M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules.* 2019;9(12):789. doi:10.3390/biom9120789.
- [27] Shien T, Iwata H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2020;50(3):225-229. doi:10.1093/jjco/hyz213.
- [28] Selli C, Sims AH. Neoadjuvant therapy for breast cancer as a model for translational research. *Breast Cancer (Auckl).* 2019;13:1178223419829072. doi:10.1177/1178223419829072.
- [29] Untch M, Konecny GE, Paepke S, von Minckwitz G. Current and future role of neoadjuvant therapy for breast cancer. *Breast.* 2014;23(5):526-537. doi:10.1016/j.breast.2014.06.004.
- [30] Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of breast cancer therapy. *PET Clin.* 2018;13(3):339–354. doi:10.1016/j.cpet.2018.02.006.

- [31] Pondé NF, Zardavas D, Piccart M. Progress in adjuvant systemic therapy for breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16:27–44. doi:10.1038/s41571-018-0089-9.
- [32] Anampa J, Makower D, Sparano JA. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC Med*. 2015;13:195. doi:10.1186/s12916-015-0439-8.
- [33] Eccles SA, Aboagye EO, Ali S, Anderson AS, Armes J, Berditchevski F, et al. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013;15(5):R92. doi:10.1186/bcr3493.
- [34] Jonczyk MM, Jean J, Graham R, Chatterjee A. Surgical trends in breast cancer: a rise in novel operative treatment options over a 12 year analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;173(2):267-274. doi:10.1007/s10549-018-5018-1.
- [35] Lu Y, Liu W. Selective Estrogen Receptor Degraders (SERDs): a promising strategy for estrogen receptor positive endocrine-resistant breast cancer. *J Med Chem*. 2020;63(24):15094-15114. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00913.
- [36] Sambhi M, Qorri B, Harless W, Szewczuk MR. Therapeutic options for metastatic breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1152:131-172. doi:10.1007/978-3-030-20301-6_8.
- [37] Fang M, Marta GN. Hypofractionated and hyper-hypofractionated radiation therapy in postoperative breast cancer treatment. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2020;66(9):1301-1306. doi:10.1590/1806-9282.66.9.1301.
- [38] Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Zhang S, Gong Z, et al. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):204. doi:10.1186/s13046-020-01709-5.
- [39] Mittal S, Brown NJ, Holen I. The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(3):227-243. doi:10.1080/14737159.2018.1439382.
- [40] Markiewski MM, Daugherty E, Reese B, Karbowniczek M. The role of complement in angiogenesis. *Antibodies (Basel)*. 2020;9(4):67. doi:10.3390/antib9040067.
- [41] Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdyntseva N, Pavlov V, et al. Tumor-Associated Macrophages in human breast, colorectal, lung, ovarian and prostate cancers. *Front Oncol*. 2020;10:566511. doi:10.3389/fonc.2020.566511.
- [42] Bielawski K, Rhone P, Bulsa M, Ruszkowska-Ciastek B. Pre-operative combination of normal BMI with elevated YKL-40 and leptin but lower adiponectin level is linked to a higher risk of breast cancer relapse: a report of four-year follow-up study. *J Clin Med*. 2020;9(6):1742. doi:10.3390/jcm9061742.
- [43] Wan G, Xiang L, Sun X, Wang X, Li H, Ge W, et al. Elevated YKL-40 expression is associated with a poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(3):5382-5391. doi:10.18632/oncotarget.14280.

- [44] Zorena K, Jachimowicz-Duda O, Ślęzak D, Robakowska M, Mrugacz M. Adipokines and obesity. Potential link to metabolic disorders and chronic complications. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10):3570. doi:10.3390/ijms21103570.
- [45] Iyengar NM, Gucalp A, Dannenberg AJ, Hudis CA. Obesity and cancer mechanisms: tumor microenvironment and inflammation. *J Clin Oncol.* 2016;34(35):4270-4276. doi:10.1200/JCO.2016.67.4283.
- [46] Atoum MF, Alzoughool F, Al-Hourani H. Linkage between obesity leptin and breast cancer. *Breast Cancer (Auckl).* 2020;14:1-8. doi:10.1177/1178223419898458.
- [47] Artac M, Altundag K. Leptin and breast cancer: an overview. *Med Oncol.* 2012;29(3):1510-1514. doi:10.1007/s12032-011-0056-0.
- [48] Fox SB, Generali DG, Harris AL. Breast tumour angiogenesis. *Breast Cancer Res.* 2007;9(6):216. doi:10.1186/bcr1796.
- [49] Katayama Y, Uchino J, Chihara Y, Tamiya N, Kaneko Y, Yamada T, et al. Tumor neovascularization and developments in therapeutics. *Cancers (Basel).* 2019;11(3):316. doi:10.3390/cancers11030316.
- [50] Viallard C, Larrivé B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis.* 2017;20(4):409-426. doi:10.1007/s10456-017-9562-9.
- [51] Logsdon EA, Finley SD, Popel AS, Mac Gabhann F. A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J Cell Mol Med.* 2014;18(8):1491-1508. doi:10.1111/jcmm.12164.
- [52] Badodekar N, Sharma A, Patil V, Telang G, Sharma R, Patil S, et al. Angiogenesis induction in breast cancer: a paracrine paradigm. *Cell Biochem Funct.* 2021;39(7):860-873. doi:10.1002/cbf.3663.
- [53] Braile M, Marcella S, Cristinziano L, Galdiero MR, Modestino L, Ferrara AL, et al. VEGF-A in cardiomyocytes and heart diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5294. doi:10.3390/ijms21155294.
- [54] López-Pedrerá C, Barbarroja N, Dorado G, Siendones E, Velasco F. Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies. *Leukemia.* 2006;20(8):1331-1340. doi:10.1038/sj.leu.2404264.
- [55] Liu Y, Tamimi RM, Collins LC, Schnitt SJ, Gilmore HL, Connolly JL, et al. The association between vascular endothelial growth factor expression in invasive breast cancer and survival varies with intrinsic subtypes and use of adjuvant systemic therapy: results from the Nurses' Health Study. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;129(1):175-84. doi:10.1007/s10549-011-1432-3.
- [56] Zarychta E, Rhone P, Bielawski K, Rosc D, Szot K, Zdunska M, et al. Elevated plasma levels of tissue factor as a valuable diagnostic biomarker with relevant efficacy for prediction of breast cancer morbidity. *J Physiol Pharmacol.* 2018;69(6). doi:10.26402/jpp.2018.6.06.
- [57] Zhao X, Liu HQ, Li J, Liu XL. Endothelial progenitor cells promote tumor growth and progression by enhancing new vessel formation. *Oncol Lett.* 2016;12(2):793-799. doi:10.3892/ol.2016.4733.

- [58] Bondarenko NA, Poveshchenko OV, Lykov AP, Kim II, Surovtseva MA, Poveshchenko AF, et al. Study of cytokine profile of cultured "early" and "late" endothelial progenitor cells in peripheral blood of chronic heart failure patients after mobilization course with Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Bull Exp Biol Med.* 2015;160(2):249-51. doi:10.1007/s10517-015-3141-0.
- [59] Rhone P, Bielawski K, Ziołkowska K, Rość D, Ruszkowska-Ciastek B. Low pre-treatment count of circulating endothelial progenitors as a prognostic biomarker of the high risk of breast cancer recurrence. *J Clin Med.* 2019;8(11):1984. doi:10.3390/jcm8111984.
- [60] Moschetta M, Mishima Y, Sahin I, Manier S, Glavey S, Vacca A, et al. Role of endothelial progenitor cells in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846(1):26-39. doi:10.1016/j.bbcan.2014.03.005.
- [61] Nadir Y. Heparanase in the coagulation system. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1221:771-784. doi:10.1007/978-3-030-34521-1_33.
- [62] Mitrugno A, Tormoen GW, Kuhn P, McCarty OJ. The prothrombotic activity of cancer cells in the circulation. *Blood Rev.* 2016;30(1):11-19. doi:10.1016/j.blre.2015.07.001.
- [63] Rubio-Jurado B, Balderas-Peña LM, García-Luna EE, Zavala-Cerna MG, Riebeling-Navarro C, Reyes PA, et al. Obesity, thrombotic risk, and inflammation in cancer. *Adv Clin Chem.* 2018;85:71-89. doi:10.1016/bs.acc.2018.02.006.
- [64] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97:4-27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [65] Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014;15(12):1243-53.
- [66] Paolillo M, Schinelli S. Extracellular matrix alterations in metastatic processes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4947. doi:10.3390/ijms20194947.
- [67] Aghlara-Fotovvat S, Nash A, Kim B, Krencik R, Veisheh O. Targeting the extracellular matrix for immunomodulation: applications in drug delivery and cell therapies. *Drug Deliv Transl Res.* 2021;11(6):2394-2413. doi:10.1007/s13346-021-01018-0.
- [68] Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):786-801. doi:10.1038/nrm3904.
- [69] Cox TR. The matrix in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(4):217-238. doi:10.1038/s41568-020-00329-7.
- [70] Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3028. doi:10.3390/ijms19103028.
- [71] Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J.* 2019;286(15):2830-2869. doi:10.1111/febs.14818.
- [72] Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7):a004952. doi:10.1101/cshperspect.a004952.

- [73] Pinhal MAS, Melo CM, Nader HB. The good and bad sides of heparanase-1 and heparanase-2. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1221:821-845. doi:10.1007/978-3-030-34521-1_36.
- [74] Jayatilleke KM, Hulett MD. Heparanase and the hallmarks of cancer. *J Transl Med.* 2020;18(1):453. doi:10.1186/s12967-020-02624-1.
- [75] Chhabra M, Ferro V. The development of assays for heparanase enzymatic activity: towards a gold standard. *Molecules.* 2018;23(11):2971. doi:10.3390/molecules23112971.
- [76] Gaskin SM, Soares Da Costa TP, Hulett MD. Heparanase: cloning, function and regulation. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1221:189-229. doi:10.1007/978-3-030-34521-1_7.
- [77] Masola V, Zaza G, Gambaro G, Franchi M, Onisto M. Role of heparanase in tumor progression: molecular aspects and therapeutic options. *Semin Cancer Biol.* 2020;62:86-98. doi:10.1016/j.semcan.2019.07.014.
- [78] Wu L, Davies GJ. An overview of the structure, mechanism and specificity of human heparanase. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1221:139-167. doi:10.1007/978-3-030-34521-1_5.
- [79] Nasser NJ. Heparanase involvement in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:1706-1715, doi:10.1007/s00018-008-7584-6.
- [80] Vlodavsky I, Gross-Cohen M, Weissmann M, Ilan N, Sanderson RD. Opposing functions of heparanase-1 and heparanase-2 in cancer progression. *Trends Biochem Sci.* 2018;43(1):18-31. doi:10.1016/j.tibs.2017.10.007.
- [81] Ruszkowska-Ciastek B, Bielawski K, Zarychta E, Rhone P. Impact of adjuvant treatment on heparanase concentration in invasive, unilateral breast cancer patients: results of a prospective single-centre cohort study. *J Clin Med.* 2021;10(10):2184. doi:10.3390/jcm10102184.
- [82] Shu J, Santulli G. Heparanase in health and disease: the neglected housekeeper of the cell? *Atherosclerosis.* 2019;283:124-126. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2019.01.017.
- [83] Agelidis A, Shukla D. Heparanase, heparan sulfate and viral infection. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1221:759-770. doi:10.1007/978-3-030-34521-1_32.
- [84] Simeonovic CJ, Popp SK, Brown DJ, Li FJ, Lafferty ARA, Freeman C, et al. Heparanase and type 1 diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1221:607-630. doi:10.1007/978-3-030-34521-1_24.
- [85] Khanna M, Parish CR. Heparanase: historical aspects and future perspectives. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1221:71-96. doi:10.1007/978-3-030-34521-1_3.
- [86] Ilan N, Bhattacharya U, Barash U, Boyango I, Yanku Y, Gross-Cohen M, Vlodavsky I. Heparanase-the message comes in different flavors. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1221:253-283. doi:10.1007/978-3-030-34521-1_9.
- [87] Zahavi T, Salmon-Divon M, Salgado R, Elkin M, Hermano E, Rubinstein AM, et al. Heparanase: a potential marker of worse prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2021;7(1):67. doi:10.1038/s41523-021-00277-x.

- [88] Putz EM, Mayfosh AJ, Kos K, Barkauskas DS, Nakamura K, Town L, et al. NK cell heparanase controls tumor invasion and immune surveillance. *J Clin Invest*. 2017;127(7):2777-2788. doi:10.1172/JCI92958.
- [89] Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. *Nat Med*. 2015;21(5):524-529. doi:10.1038/nm.3833.
- [90] Theodoro TR, Matos LL, Cavaleiro RP, Justo GZ, Nader HB, Pinhal MAS. Crosstalk between tumor cells and lymphocytes modulates heparanase expression. *J Transl Med*. 2019;17(1):103. doi:10.1186/s12967-019-1853-z.
- [91] Sun X, Zhang G, Nian J, Yu M, Chen S, Zhang Y, et al. Elevated heparanase expression is associated with poor prognosis in breast cancer: a study based on systematic review and TCGA data. *Oncotarget*. 2017;8(26):43521-43535. doi:10.18632/oncotarget.16575.
- [92] Xiong A, Spyrou A, Forsberg-Nilsson K. Involvement of heparan sulfate and heparanase in neural development and pathogenesis of brain tumors. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1221:365-403. doi:10.1007/978-3-030-34521-1_14.
- [93] Purushothaman A, Sanderson RD. Heparanase: a dynamic promoter of myeloma progression. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1221:331-349. doi:10.1007/978-3-030-34521-1_12.
- [94] Li J, Pan Q, Rowan PD, Trotter TN, Peker D, Regal KM, et al. Heparanase promotes myeloma progression by inducing mesenchymal features and motility of myeloma cells. *Oncotarget*. 2016;7(10):11299-11309. doi:10.18632/oncotarget.7170.
- [95] Waisberg J, Theodoro TR, Matos LL, Orlandi FB, Serrano RL, Saba GT, et al. Immunohistochemical expression of heparanase isoforms and syndecan-1 proteins in colorectal adenomas. *Eur J Histochem*. 2016;60(1):2590. doi:10.4081/ejh.2016.2590.
- [96] Yang Y, Maimaitiyiming X, Jin C, Ahan N, Guo R, Peng C. Influence of heparanase and VEGF-C mRNA expressions in lung cancer. *Indian J Surg*. 2015;77(6):477-480. doi:10.1007/s12262-015-1291-y.
- [97] Kundu S, Xiong A, Spyrou A, Wicher G, Marinescu VD, Edqvist PD, et al. Heparanase promotes glioma progression and is inversely correlated with patient survival. *Mol Cancer Res*. 2016;14(12):1243-1253. doi:10.1158/1541-7.
- [98] Gomes AM, Stelling MP, Pavão MS. Heparan sulfate and heparanase as modulators of breast cancer progression. *Biomed Res Int*. 2013;2013:852093. doi:10.1155/2013/852093.
- [99] Yang WJ, Shi L, Wang XM, Yang GW. Heparanase is a novel biomarker for immune infiltration and prognosis in breast cancer. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(16):20836-20852. doi:10.18632/aging.203489.
- [100] Vornicova O, Naroditsky I, Boyango I, Shachar SS, Mashiach T, Ilan N, et al. Prognostic significance of heparanase expression in primary and metastatic breast carcinoma. *Oncotarget*. 2017;9(5):6238-6244. doi:10.18632/oncotarget.23560.

VIII. SPIS RYCIŃ

Rycina 1. Budowa gruczołu piersiowego w modyfikacji własnej	10
Rycina 2. Teorie powstawania nowotworów piersi (rycina własna).....	11
Rycina 3. Pochodzenie podtypów nowotworów piersi na podstawie teorii komórek macierzystych w modyfikacji własnej.....	12
Rycina 4. Pochodzenie podtypów nowotworów piersi na podstawie teorii stochastycznej w modyfikacji własnej	13
Rycina 5. Czynniki wpływające na wystąpienie raka piersi na podstawie Sun i wsp.	16
Rycina 6. Aktualnie stosowane klasyfikacje raka piersi.....	17
Rycina 7. Histologiczna klasyfikacja raka piersi na podstawie Cserni	18
Rycina 8. Podtypy molekularne nowotworu piersi ze względu na ekspresję wybranych markerów.....	19
Rycina 9. Klasyfikacja wielkości guza pierwotnego (T), statusu zajęcia regionalnych węzłów chłonnych (N) oraz obecności przerzutów odległych (M) w raku piersi na podstawie Giuliano i wsp.	21
Rycina 10. Klasyfikacja stopnia zaawansowania klinicznego raka piersi wg klasyfikacji TNM na podstawie Giuliano i wsp.....	21
Rycina 11. Klasyfikacja stopnia złośliwości histologicznej raka piersi w modyfikacji Elston-Ellis na podstawie Jassem i wsp.....	23
Rycina 12. Metody wykorzystywane w leczeniu raka piersi (rycina własna)	24
Rycina 13. Podział leczenia uzupełniającego (rycina własna)	24
Rycina 14. Podział leczenia chirurgicznego raka piersi.....	27
Rycina 15. Schemat budowy mikrośrodowiska nowotworowego na podstawie Mittal i wsp.	31
Rycina 16. Wpływ YKL-40 na stan zapalny w mikrośrodowisku nowotworowym (rycina własna)	35
Rycina 17. Deregulacja profilu adipokin w przebiegu nadwagi i otyłości promująca proces zapalny (rycina własna)	37
Rycina 18. Udział nadwagi oraz otyłości w promowaniu wzrostu i inwazji nowotworu (rycina własna).....	38

Rycina 19. Neowaskularyzacja z uwzględnieniem angiogenezy oraz waskulogenezy w modyfikacji własnej	40
Rycina 20. Etapy waskulogenezy w procesie nowotworowym (rycina własna)	45
Rycina 21. Udział czynnika tkankowego w wybranych procesach biologicznych na podstawie López-Pedrera i wsp.	47
Rycina 22. Procesy, w których pośredniczą proteoglikany siarczanu heparanu na podstawie Sarrazin i wsp.....	50
Rycina 23. Główne cechy heparanazy	52
Rycina 24. Biogeneza heparanazy na podstawie Hulett i wsp.	53
Rycina 25. Aktywność enzymatyczna heparanazy na przykładzie neowaskulogenezy (rycina własna).....	54
Rycina 26. Budowa przykładowego proteoglikanu siarczanu heparanu wraz ze wskazaniem miejsca potencjalnego działania heparanazy na podstawie Wu i wsp.	55
Rycina 27. Aktywność nieenzymatycznej heparanazy na przykładzie neowaskulogenezy (rycina własna).....	56
Rycina 28. Rola heparanazy w procesie nowotworowym (rycina własna)	59
Rycina 29. Działanie oraz główne cechy heparanazy-2	61

IX. SPIS TABEL

Tabela 1. Szacowana zachorowalność na raka piersi oraz nowotwory wśród kobiet w 2020 roku na podstawie danych WHO	14
Tabela 2. Szacowana śmiertelność na raka piersi oraz nowotwory wśród kobiet w 2020 roku na podstawie danych WHO	15
Tabela 3. Wybrane czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi w modyfikacji własnej.....	16
Tabela 4. Przykładowe różnice pomiędzy stopniem zaawansowania wg klasyfikacji TNM a stopniem zaawansowania prognostycznego w zależności od statusu markerów molekularnych	22
Tabela 5. Rodzaje terapii neoadjuwantowej	25
Tabela 6. Możliwości ogólnoustrojowej terapii adjuwantowej w raku piersi w modyfikacji własnej.....	26
Tabela 7. Podział leków stosowanych w hormonoterapii raka piersi w zależności od mechanizmu działania	28
Tabela 8. Przykładowe leki stosowane w chemioterapii raka piersi w zależności od mechanizmu działania	29
Tabela 9. Lokalizacja oraz częstość występowania przerzutów w raku piersi w zależności od podtypu molekularnego	33
Tabela 10. Wybrane endogenne modulatory angiogenezy	42
Tabela 11. Mechanizmy działania heparanazy w wybranych jednostkach chorobowych.....	58
Tabela 12. Mechanizmy działania heparanazy w regulacji podstawowych cech nowotworu .	62
Tabela 13. Mechanizmy działania heparanazy w wybranych nowotworach	64

X. OŚWIADCZENIA



Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 547/2015

Bydgoszcz, 16.06.2015r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu 16.06.2015 r. przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

dr n. med. Barbara Ruszkowska-Ciastek
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie:

- prof. dr hab. n. med. D. Rość, dr n. med. B. Ruszkowska-Ciastek,
dr n. med. P. Rhone, dr n. med. K. Góralezyk, dr n. med. J. Boinska,
mgr inż. B. Góralezyk, mgr K. Stankowska, magistranci Katedry Patofizjologii Wydział Farmaceutyczny CM UMK

w sprawie badania:

„Angiogeneza i hemostaza oraz wybrane hormony regulujące gospodarkę węglowodanową u kobiet z rozpoznanym rakiem sutka wczesnej fazy. ”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania w tym również uczestników stanowiących grupę kontrolną o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania, a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- UWAGA! Uczestnicy badania stanowiący grupę kontrolną nie mogą być rekrutowani spośród studentów lub pracowników Collegium Medicum w Bydgoszczy.
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;

- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (16.06.2015 r.) do końca 2020 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
dr n. med. Barbara Ruszkowska-Ciastek
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Piotr Rhone
Oddział Kliniczny Nowotworów Piersi
i Chirurgii Rekonstrukcyjnej
Centrum Onkologii w Bydgoszczy

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Bielawski K, Rhone P, Bielawska S, Rosc D, Brkie A, Zarychta E, Ruszkowska-Ciastek B. Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate. J Physiol Pharmacol. 2019; 70(3): 455-466; polegał na kwalifikacji pacjentów do badania.

Piotr Rhone



Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Sylwia Bielawska
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Bielawski K, Rhone P, Bielawska S, Rosc D, Brkic A, Zarychta E, Ruszkowska-Ciastek B. Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate. J Physiol Pharmacol. 2019; 70(3): 455-466; polegał na wstępnej obróbce materiału.

Sylwia Bielawska

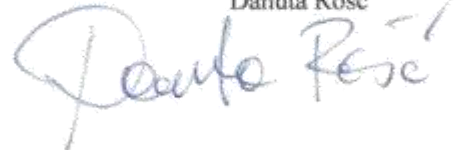


Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Danuta Rość
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Bielawski K, Rhone P, Bielawska S, Rosc D, Brkic A, Zarychta E, Ruszkowska-Ciastek B. Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate. J Physiol Pharmacol. 2019; 70(3): 455-466; polegał na wstępnej analizie wyników.

Danuta Rość


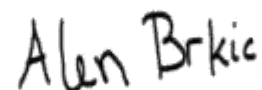
Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Alen Brkic
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Bielawski K, Rhone P, Bielawska S, Rosc D, Brkic A, Zarychta E, Ruskowska-Ciastek B. Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate. J Physiol Pharmacol. 2019; 70(3): 455-466; polegał na wstępnej obróbce materiału.

Alen Brkic



Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Elżbieta Zarychta
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Bielawski K, Rhone P, Bielawska S, Rosc D, Brkic A, Zarychta E, Ruszkowska-Ciastek B. Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate. *J Physiol Pharmacol.* 2019; 70(3): 455-466; polegał na wstępnej analizie wyników.

Elżbieta Zarychta



Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Barbara Ruszkowska-Ciastek
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Bielawski K, Rhone P, Bielawska S, Rosc D, Brkic A, Zarychta E, Ruszkowska-Ciastek B. Heparanase link between vasculogenesis and angiogenesis as well as a predictive factor of a shorter survival rate. J Physiol Pharmacol. 2019; 70(3): 455-466; polegał na krytycznej weryfikacji wyników oraz na ocenie sporządzonego manuskryptu.

Barbara Ruszkowska-Ciastek



Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Piotr Rhone
Oddział Kliniczny Nowotworów Piersi
i Chirurgii Rekonstrukcyjnej
Centrum Onkologii w Bydgoszczy

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Bielawski K, Rhone P, Bulsa M, Ruszkowska-Ciastek B. Pre-operative combination of normal BMI with elevated YKL-40 and leptin but lower adiponectin level is linked to a higher risk of breast cancer relapse: a report of four-year follow-up study. J Clin Med. 2020; 9(6): 1742; polegał na kwalifikacji pacjentów do badania.

Piotr Rhone



Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Barbara Ruskowska-Ciastek
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Bielawski K, Rhone P, Bulsa M, Ruskowska-Ciastek B. Pre-operative combination of normal BMI with elevated YKL-40 and leptin but lower adiponectin level is linked to a higher risk of breast cancer relapse: a report of four-year follow-up study. J Clin Med. 2020; 9(6): 1742; polegał na krytycznej weryfikacji wyników oraz na ocenie sporządzonego manuskryptu.

Barbara Ruskowska-Ciastek



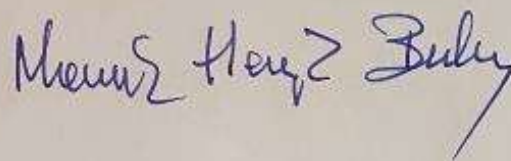
Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Marek Balsa
Zakład Socjologii Zdrowia i Zachowań Prozdrowotnych,
Instytut Socjologii, Uniwersytet Szczeciński

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Bielawski K, Rhone P, Balsa M, Ruszkowska-Ciastek B. Pre-operative combination of normal BMI with elevated YKL-40 and leptin but lower adiponectin level is linked to a higher risk of breast cancer relapse: a report of four-year follow-up study. J Clin Med. 2020; 9(6): 1742; polegał na wstępnej analizie wyników.

Marek Balsa



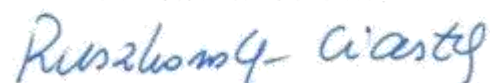
Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Barbara Ruszkowska-Ciastek
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Ruszkowska-Ciastek B*, Bielawski K*, Zarychta E, Rhone P. Impact of adjuvant treatment on heparanase concentration in invasive, unilateral breast cancer patients: results of a prospective single-centre cohort study. J Clin Med. 2021; 10(10): 2184; polegał na krytycznej weryfikacji wyników oraz na ocenie sporządzonego manuskryptu.

Barbara Ruszkowska-Ciastek



Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Elżbieta Zarychta
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Ruszkowska-Ciastek B*, Bielawski K*, Zarychta E, Rhone P. Impact of adjuvant treatment on heparanase concentration in invasive, unilateral breast cancer patients: results of a prospective single-centre cohort study. *J Clin Med.* 2021; 10(10): 2184; polegał na wstępnej analizie wyników.

Elżbieta Zarychta



Bydgoszcz, 21.01.2022 r.

Piotr Rhone
Oddział Kliniczny Nowotworów Piersi
i Chirurgii Rekonstrukcyjnej
Centrum Onkologii w Bydgoszczy

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w tworzeniu publikacji Ruszkowska-Ciastek B*, Bielawski K*, Zarychta E, Rhone P. Impact of adjuvant treatment on heparanase concentration in invasive, unilateral breast cancer patients: results of a prospective single-centre cohort study. J Clin Med. 2021; 10(10): 2184; polegał na kwalifikacji pacjentów do badania.

Piotr Rhone

