



**UNIwersYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2024 r.



**UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katarzyna Kwiatkowska

Ocena przydatności oznaczenia wybranych markerów wydzielanych przez komórki śródbłonka naczyniowego oraz tkankę tłuszczową jako czynników prognostycznych w grupie pacjentek z pierwotnym rakiem piersi

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Promotor:

dr hab. n. med. Barbara Ciastek

Bydgoszcz 2024 r.

Spis treści

| | |
|---|----|
| Wykaz skrótów | 7 |
| I. WSTĘP | 10 |
| 1. Nowotwór piersi | 10 |
| 1.1. Budowa gruczołu piersiowego | 10 |
| 1.2. Definicja raka piersi | 11 |
| 1.3. Epidemiologia | 11 |
| 1.4. Etiopatogeneza | 12 |
| 1.4.1. Niemodyfikowalne czynniki ryzyka | 12 |
| 1.4.2. Modyfikowalne czynniki ryzyka | 14 |
| 1.5. Diagnostyka | 16 |
| 1.6. Klasyfikacja nowotworu piersi | 17 |
| 1.6.1. Klasyfikacja histologiczna | 18 |
| 1.6.2. Klasyfikacja molekularna/biologiczna | 19 |
| 1.6.3. Klasyfikacja TNM | 19 |
| 1.6.4. System oceny złośliwości histologicznej Elston-Ellis | 21 |
| 1.7. Leczenie raka piersi | 22 |
| 1.7.1. Leczenie neoadjuwantowe | 23 |
| 1.7.2. Leczenie adjuwantowe | 24 |
| 1.7.3. Leczenie chirurgiczne | 24 |
| 1.7.4. Radioterapia | 25 |
| 1.7.5. Chemioterapia | 26 |
| 1.7.6. Hormonoterapia | 27 |
| 1.7.7. Immunoterapia | 28 |
| 2. Tkanka tłuszczowa | 30 |
| 2.1. Budowa i rodzaje tkanki tłuszczowej | 30 |
| 2.2. Funkcje tkanki tłuszczowej | 32 |
| 2.3. Dysfunkcje tkanki tłuszczowej | 33 |
| 2.4. Rola tkanki tłuszczowej w procesie nowotworzenia | 34 |
| 2.4.1. Rola tkanki tłuszczowej w rozwoju nowotworu piersi | 35 |
| 2.5. Leptyna | 36 |

| | |
|---|-----|
| 2.5.1. Budowa strukturalna i biologiczne funkcje | 36 |
| 2.5.2. Zależność między leptyną a nowotworzeniem | 37 |
| 2.6. Adiponektyna | 38 |
| 2.6.1. Budowa strukturalna i biologiczne funkcje | 38 |
| 2.6.2. Zależność między adiponektyną a nowotworzeniem | 38 |
| 2.7. Stosunek leptyny do adiponektyny (LAR) | 39 |
| 3. Śródbłonek naczyniowy | 41 |
| 3.1. Budowa i funkcja śródbłonka naczyniowego | 41 |
| 3.2. Definicja uszkodzenia komórek śródbłonka naczyniowego | 43 |
| 3.3. Biomarkery uszkodzenia komórek śródbłonka naczyniowego | 44 |
| 3.3.1. Rozpuszczalna forma selektyny P | 44 |
| 3.3.2. Rozpuszczalna forma selektyny E | 45 |
| 3.3.3. Znaczenie selektyn w chorobach nowotworowych | 46 |
| 4 Hemostaza | 48 |
| 4.1. Hemostaza pierwotna | 48 |
| 4.2. Hemostaza wtórna | 49 |
| 4.3. Czynniki von Willebranda | 53 |
| 4.3.1. Biosynteza i fizjologiczna rola czynnika von Willebranda | 53 |
| 4.3.2. Znaczenie czynnika von Willebranda w chorobach nowotworowych | 53 |
| 4.4. Fibrynliza | 54 |
| 4.4.1. Tkankowy aktywator plazminogenu a proces nowotworowy | 56 |
| 4.4.2. Inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 a nowotworzenie | 56 |
| 5. Graficzne podsumowanie wstępu | 57 |
| II. CEL | 58 |
| III. MATERIAŁY I METODY | 59 |
| IV. CYKL PUBLIKACJI | 60 |
| V. WNIOSKI | 133 |
| VI. PODSUMOWANIE I OGRANICZENIA BADANIA | 135 |
| VII. STRESZCZENIA | 137 |
| VIII. PIŚMIENNICTWO | 143 |
| IX. SPIS RYCIN | 157 |
| X. SPIS TABEL | 158 |

| | | |
|------|--------------------------------|-----|
| XI. | OŚWIADCZENIA | 159 |
| XII. | ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ..... | 170 |

Wykaz skrótów

| SKRÓT | POLSKIE ROZWIINIĘCIE SKRÓTU | ANGIELSKIE ROZWIINIĘCIE SKRÓTU |
|---------|--|--|
| APTT | czas częściowej tromboplastyny po aktywacji | activated partial thromboplastin time |
| BAT | brązowa tkanka tłuszczowa | brown adipose tissue |
| BCS | operacja oszczędzająca piersć | breast-conserving surgery |
| BeAT | beżowa tkanka tłuszczowa | beige adipose tissue |
| BI-RADS | System Standaryzacji Opisów Badań Obrazowych Piersi | Breast Imaging Reporting and Data Systems |
| CAA | adipocyty związane z nowotworem | cancer-associated adipocytes |
| CCL2 | chemokina MCP-1, białkowy chemoatraktant monocytów | monocyte chemoattractant protein 1 |
| CCL5 | chemokina ligand 5 | C-C motif chemokine ligand 5 |
| DFS | przeżycie wolne od choroby | disease-free survival |
| EC | komórki śródbłonna naczyniowego | endothelial cells |
| ER | receptor estrogenowy | oestrogen receptor |
| FGF-2 | czynnik wzrostu fibroblastów 2 | <i>fibroblast growth factor 2</i> |
| G | stopień złośliwości histologicznej | grade |
| HDL | lipoproteina o dużej gęstości | high density lipoprotein |
| HER2 | ludzki receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 | human epidermal growth factor receptor 2 |
| IARC | Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem | International Agency for Research on Cancer |
| IGHG | Międzynarodowa Grupa ds. Harmonizacji Wytycznych Dotyczących Późnych Skutków Raka u Dzieci | The International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group |

| | | |
|--------------|--|--|
| IL-6 | interleukina 6 | interleukin 6 |
| LAR | stosunek leptyny do adiponektyny | leptin-to-adiponectin ratio |
| LEPR-a | receptor dla leptyny a | leptin receptor a |
| M | przerzut | metastasis |
| N | węzły chłonne | nodule |
| NF-κB | szlak czynnika transkrypcyjnego NF-κB | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| OS | całkowite przeżycie | overall survival |
| PAI-1 | inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 | plasminogen activator inhibitor type 1 |
| PFS | przeżycie wolne od progresji choroby | progression-free survival |
| PR | receptor progesteronowy | progesterone receptor |
| PSGL-1 | ligand glikoproteinowy-1 selektyny P | P-selectin glycoprotein ligand-1 |
| SERM | selektywne modulatory receptorów estrogenowych | selective estrogen receptor modulators |
| sE-selektyna | rozpuszczalna forma selektyny E | soluble form of selectin E |
| sP-selektyna | rozpuszczalna forma selektyny P | soluble form of selectin P |
| ST | sialilotransferaza | sialyltransferase |
| SVR | frakcja komórek macierzystych | stromal vascular fraction |
| T | guz | tumour |
| TAFI | aktywowany trombiną inhibitor fibrynolizy | thrombin activatable fibrinolysis inhibitor |
| TNF-α | czynnik martwicy nowotworu α | tumour necrosis factor α |
| t-PA | tkankowy aktywator plazminogenu | <i>tissue plasminogen activator</i> |
| u-PA | aktywator plasminogenu typu urokinazowego | urokinase plasminogen activator |
| USG | badanie ultrasonograficzne | ultrasonography |

| | | |
|------|--|------------------------------------|
| VTE | żylna choroba zakrzepowo-zatorowa | venous thromboembolism |
| vWF | czynnik von Willebranda | von Willebrand factor |
| VEGF | czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego | vascular endothelial growth factor |
| WAT | biała tkanka tłuszczowa | white adipose tissue |
| WHO | Światowa Organizacja Zdrowia | World Health Organization |

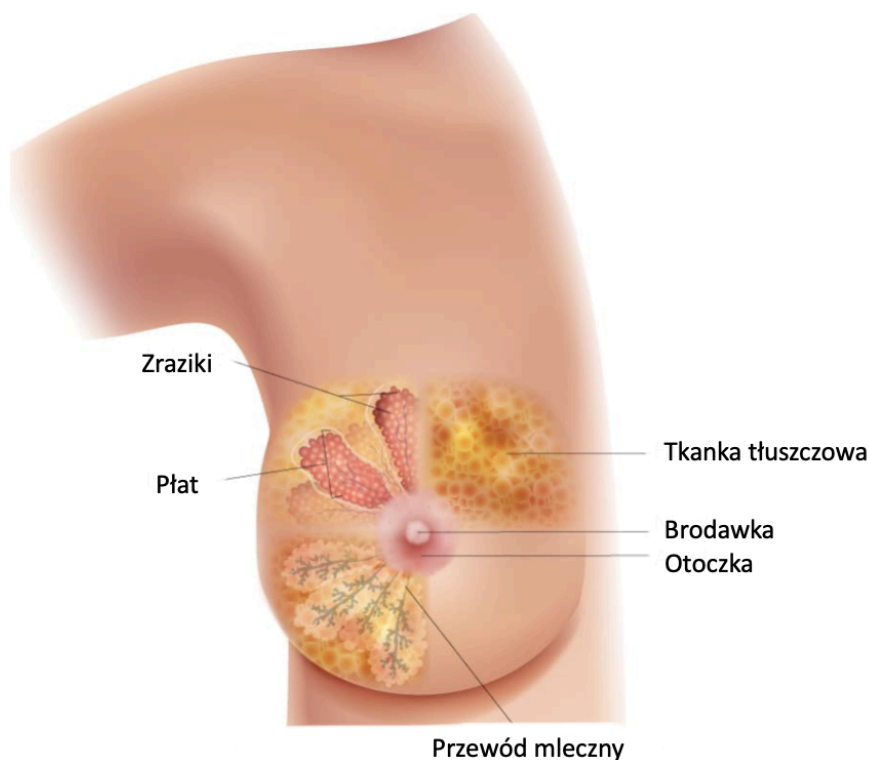
I. WSTĘP

1. Nowotwór piersi

1.1 Budowa gruczołu piersiowego

Gruczoł piersiowy jest unikalnym narządem pod względem anatomicznym, który dzięki swojej funkcji wydzielania mleka umożliwia ssakom karmienie swojego potomstwa [1].

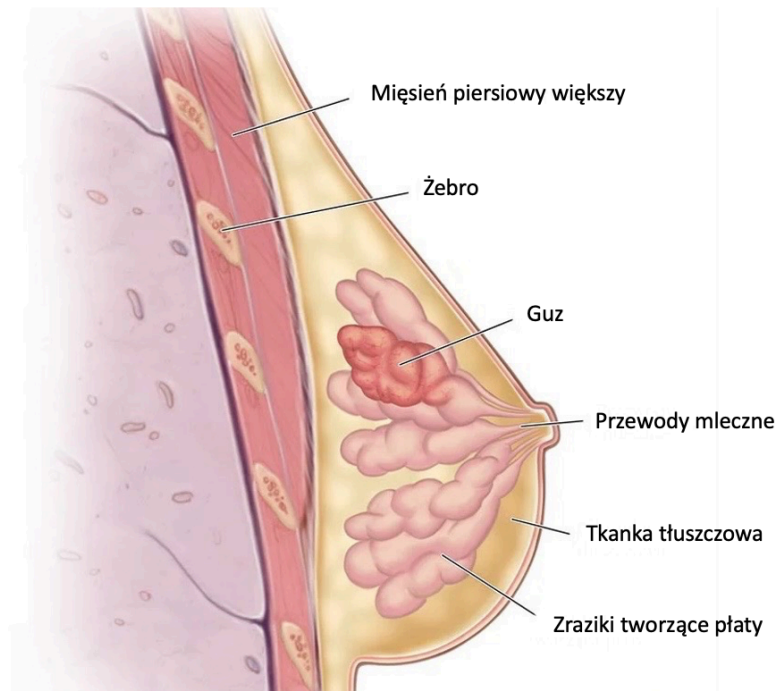
Kobieca pierś leży na przedniej ścianie klatki piersiowej i rozciąga się między 2 a 6 żebrem [2]. Około dwie trzecie piersi pokrywa mięsień piersiowy większy a pozostała część styka się z przednim mięśniem zębatym oraz górną częścią mięśnia skośnego brzucha. Sutek jest zbudowany z 3 głównych warstw: skóry, tkanki podskórnej oraz tkanki piersi [3]. Na tkankę piersi składają się: komponenta nabłonkowa (10-15% całkowitej objętości gruczołu) oraz zrąb [4]. Zrąb piersi stanowi 15-20 płatów, które są dalej podzielone na zraziki (między 20 a 40) a następnie na gruczoły kanalikowo-pęcherzykowe. Każdy tak zbudowany płat sływa do głównego przewodu mlecznego. Przestrzeń pomiędzy płatami wypełniona jest tkanką tłuszczową [3]. Prawidłowa budowa piersi została przedstawiona na rycinie 1.



Rycina 1. Prawidłowa budowa gruczołu piersiowego (modyfikacja własna) [5].

1.2. Definicja raka piersi

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization) rak piersi to choroba, w której nieprawidłowe komórki piersi wymykają się spod kontroli mechanizmu regulacji cyklu komórkowego tworząc guzy [6]. Na rycinie 2 przedstawiono budowę gruczołu piersiowego wraz z guzem.



Rycina 2. Budowa gruczołu piersiowego z guzem w ujęciu bocznym (modyfikacja własna) [7].

1.3. Epidemiologia

W 2020 roku według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC, ang. International Agency for Research on Cancer) inwazyjny rak piersi stał się najczęściej diagnozowanym typem nowotworu i głównym powodem śmierci kobiet na całym świecie [8]. Szacuje się, że w 2023 roku 43 tysiące kobiet umrze z powodu raka piersi w Stanach Zjednoczonych [9]. Z danych wynika, że 1 na 8 kobiet w ciągu swojego życia rozwinie ten typ nowotworu [10].

Nowotwory złośliwe stanowią coraz większe wyzwanie społeczne, zdrowotne oraz ekonomiczne na świecie jak i w Polsce. Według Krajowego Rejestru Nowotworów rak piersi od połowy lat 70 do połowy pierwszej dekady XXI wieku był głównym powodem zgonów u kobiet. Od 2007 roku po dziś dzień plasuje się na drugim miejscu, zaraz po raku płuc jako przyczyna śmierci Polek [11].

1.4. Etiopatogeneza

Rak piersi jest silnie związany z niemodyfikowalnymi i modyfikowalnymi czynnikami ryzyka [12]. Rycina 3 przedstawia czynniki ryzyka raka piersi.



Rycina 3. Czynniki ryzyka raka piersi [12].

1.4.1. Niemodyfikowalne czynniki ryzyka

WIEK I PŁEĆ

Wiek jest najważniejszym czynnikiem ryzyka raka piersi. Średni wiek w chwili rozpoznania raka piersi wynosi 62 lata [13]. Zachorowania na raka piersi sięgają aż 99 % kobiet [14]. Jest to spowodowane przez podłoże hormonalne. U mężczyzn z zespołem Klinefeltera obserwuje się zwiększone ryzyko rozwoju tego raka [15].

CZYNNIKI GENETYCZNE I WYWIAD RODZINNY

Uważa się, że czynniki genetyczne lub dziedziczne, w tym mutacje genów *BRCA 1* i *2*, są odpowiedzialne za od 5% do 10% przypadków raka piersi ogółem [16]. Prawdopodobieństwo zachorowania na raka piersi wzrasta dwukrotnie u kobiet, których najbliższa krewna (matka, siostra) była leczona z powodu tego nowotworu złośliwego i od 3 do 6 razy, jeśli dwoje najbliższych krewnych miało rozpoznanego raka piersi [17]. Najlepiej poznanymi mutacjami związanymi z nowotworem piersi są mutacje w genach supresorowych *BRCA1* i *BRCA2*. Gen *BRCA1*, zlokalizowany na chromosomie 17 koduje białko jądrowe, odpowiedzialne za utrzymanie stabilności genomu. Białko to współtworzy kompleks białkowy, wiążący się z polimerazą RNA II i oddziałujący z deacetylazą histonową, wpływając w ten sposób na procesy transkrypcji, naprawy DNA czy rekombinacji. Białko *BRCA1* wraz z produktem genu *BRCA2*, zlokalizowanym na chromosomie 13, jest szczególnie zaangażowane w naprawę pęknięć podwójnej nici DNA na drodze rekombinacji homologicznej [18]. Szacuje się, że nosicielki mutacji *BRCA1/BRCA2* mają 10-krotnie większe ryzyko zachorowania na raka piersi [19].

GĘSTOŚĆ PIERSI

Uważa się, że wysoka gęstość piersi jest silnym, niezależnym czynnikiem rozwoju ryzyka raka piersi [20]. Kobiety z dużą gęstością piersi mają od czterech do sześciu razy większe ryzyko rozwoju choroby [21]. Gęstość piersi zmniejsza się wraz z wiekiem. Pacjentki młodsze, w wieku przedmenopauzalnym lub okołomenopauzalnym mają wyższy odsetek gęstej tkanki piersi (włóknisto-gruczołowej) i jest ona związana z mniejszą czułością mammograficzną [22,23]. Obecnie najczęściej używanym narzędziem do klinicznej klasyfikacji gęstości mammograficznej jest 5. edycja BI-RADS (ang. Breast Imaging Reporting and Data Systems), która została wprowadzona w 2013 r. System ten określa cztery kategorie gęstości piersi od skrajnie utkanej tkanką tłuszczową (A), rozproszonej gęstości (B), heterogenicznej gęstości (C) do skrajnie gęstej (D), z których kategoria B jest najczęściej występujące wśród kobiet w wieku przesiewowym w kierunku raka piersi [24,25].

WCZESNA MENARCHE I PÓŻNA MENOPAUZA

Czynniki związane ze stanem hormonalnym zdają się mieć ogromny wpływ na zachorowanie na raka piersi. Uważa się, że przedłużona ekspozycja nabłonka piersi na

estrogeny i progesteron produkowane przez jajniki w okresie ich aktywności, która zachodzi w przypadku wczesnej menarche i/lub późnej menopauzy zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi [26,27]. Niektóre badania wskazują, że ryzyko zachorowania na raka piersi wzrasta o 5% z każdym rokiem wczesnego początku pierwszej miesiączki oraz względnie wyższe ryzyko związane jest z wystąpieniem menopauzy w późniejszym wieku [14,28].

RADIOTERAPIA KLATKI PIERSIOWEJ

Kobiety, które w dzieciństwie miały rozpoznaną chorobę nowotworową i otrzymywały leczenie metodą radioterapii w obrębie klatki piersiowej wykazują wyższe ryzyko zachorowania na raka piersi. Międzynarodowa Grupa ds. Harmonizacji Wytycznych Dotyczących Późnych Skutków Raka u Dzieci (IGHG, ang. The International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group) opublikowała zalecenia dotyczące wykonywania badań przesiewowych u kobiet, które chorowały na nowotwór w wieku poniżej 30 roku życia i były poddane radioterapii klatki piersiowej - promieniowanie jonizujące ≥ 20 Gy. Pacjentki powinny być poddawane corocznym badaniom mammograficznym i rezonansowi magnetycznemu piersi, począwszy od wieku 25 lat lub 8 lat po radioterapii, w zależności od tego, co nastąpi później [29].

1.4.2. Modyfikowalne czynniki ryzyka

OTYŁOŚĆ, NIEPRAWIDŁOWA DIETA I BRAK AKTYWNOŚCI FIZYCZNEJ

Otyłość zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi oraz negatywnie wpływa na wystąpienie wznowy choroby oraz wiąże się z krótszym przeżyciem. Złe nawyki żywieniowe charakteryzujące się wysokim spożyciem tłuszczów nasyconych i trans oraz węglowodanów prostych, a także niskim spożyciem kwasów tłuszczowych omega-3, naturalnych przeciwutleniaczy i błonnika są silnie związane z ryzykiem i progresją raka piersi głównie poprzez aktywowanie procesu zapalnego [30]. Nadmiar tkanki tłuszczowej prowadzi do tworzenia mikrośrodowiska przewlekłego stanu zapalnego, które sprzyja rozwojowi nowotworu [31]. Ponadto, w badaniach odnotowano, że pacjentki będące aktywne fizycznie mają średnio o 25% niższe ryzyko rozwoju raka piersi [32].

WYWIAD POŁOŻNICZY, TERAPIA HORMONALNA I DWUSKŁADNIKOWA ANTYKONCEPCJA

Rak piersi uznawany jest za nowotwór hormonozależny, tj. większe ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu mają kobiety z dłuższą ekspozycją w ciągu swojego życia na estrogeny. Kobiety nieródki i te, które zaszły w pierwszą ciążę po 30 roku życia, są 2–5 razy bardziej narażone na zachorowanie [14]. Hormonalna terapia wieku menopauzalnego jest stosowana u kobiet w celu ograniczenia niepożądanych dolegliwości okołomenopauzalnych takich jak uderzenia gorąca, zlewne poty czy kołatanie serca. Ryzyko zachorowania na raka piersi w związku ze stosowaniem hormonalnej terapii wieku menopauzalnego jest porównywalne z ryzykiem związanym z wystąpieniem pierwszej miesiączki przed 12 rokiem życia lub późniejszym zajściem w ciążę [33]. Ryzyko jest większe w przypadku stosowania skojarzonej terapii estrogenowo-progesteronowej u kobiet po menopauzie niż w przypadku samej terapii estrogenowej oraz jest wyższe w przypadku nowotworów z ekspresją receptorów estrogenowych [34,35]. Według literatury, stosowanie antykoncepcji hormonalnej zwiększa o około 20% ryzyko zachorowania na raka piersi [36]. W niektórych pracach pojawia się informacja, że to ryzyko może wzrastać wraz z długością stosowania oraz, że podwyższone ryzyko może się utrzymywać 5 lat, u kobiet które stosowały te leki co najmniej 5 lat. Ponadto, uważa się, że konieczne są dalsze badania opierające się na analizie ryzyka w przypadku złożonych środków antykoncepcyjnych innych niż doustne i preparatów niezawierających lewonorgestrelu (zawierających wyłącznie progestagen) [37].

PALENIE TYTONIU I NADMIERNE SPOŻYCIE ALKOHOLU

Wiele badań wykazuje związek między paleniem papierosów a zwiększonym ryzykiem zachorowania na różne nowotwory. Ponadto, obserwuje się współzależność między ekspozycją na nikotynę a mniejszą przeżywalnością o średnio 25 % w chwili rozpoznania nowotworu piersi w porównaniu do osób niepalących [38]. Mimo, że nikotyny nie ma w wykazie substancji rakotwórczych istnieją doniesienia naukowców wskazujące na jej wpływ na progresję niektórych nowotworów w tym raka piersi. Naukowcy sugerują, że przewlekła ekspozycja na nikotynę odgrywa kluczową rolę w tworzeniu niszy przed-przerzutowej w płucach poprzez rekrutację pronowotworowych neutrofilii N2 [39]. Badania wskazują na związek pomiędzy spożywaniem alkoholu a zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi. Pochodzenia tego zjawiska należy doszukiwać się we wzroście stężenia estrogenów we

krwi poprzez hamowanie ich metabolizmu w wątrobie oraz nasilanie konwersji androgenów do estrogenów. Ponadto alkohol działa hamująco na układ odpornościowy, tj. procesy naprawy DNA przez co może nasilać proliferację i migrację komórek [14]. Naukowcy szacują, że każde spożycie 10 g czystego alkoholu dziennie zwiększa ryzyko raka piersi o 9% [40].

1.5. Diagnostyka

Regularne badania przesiewowe w kierunku raka piersi są istotne, ponieważ pozwalają na wczesne wykrycie choroby, gdy nowotwór jest na wczesnym etapie rozwoju i jest łatwiejszy do wyleczenia. Diagnostykę raka piersi można podzielić na nieinwazyjną, inwazyjną oraz innowacyjne metody diagnostyczne. Na rycinie 4 przedstawiono przykładowy schemat diagnostyki raka piersi.

a) diagnostyka nieinwazyjna

Do nieinwazyjnych badań można zaliczyć: badanie palpacyjne, badanie obrazowe tj. badanie ultrasonograficzne (USG, ang. ultrasonography) i mammograficzne [41]. American Cancer Society opublikowało wytyczne dla kobiet ze średnim ryzykiem zachorowania na raka piersi. Według zaleceń kobiety w wieku 40-44 lat powinny mieć możliwość rozpoczęcia corocznych badań przesiewowych w kierunku raka piersi za pomocą mammografii, zaś kobiety powyżej 45 lat powinny już corocznie wykonywać to badanie [42].

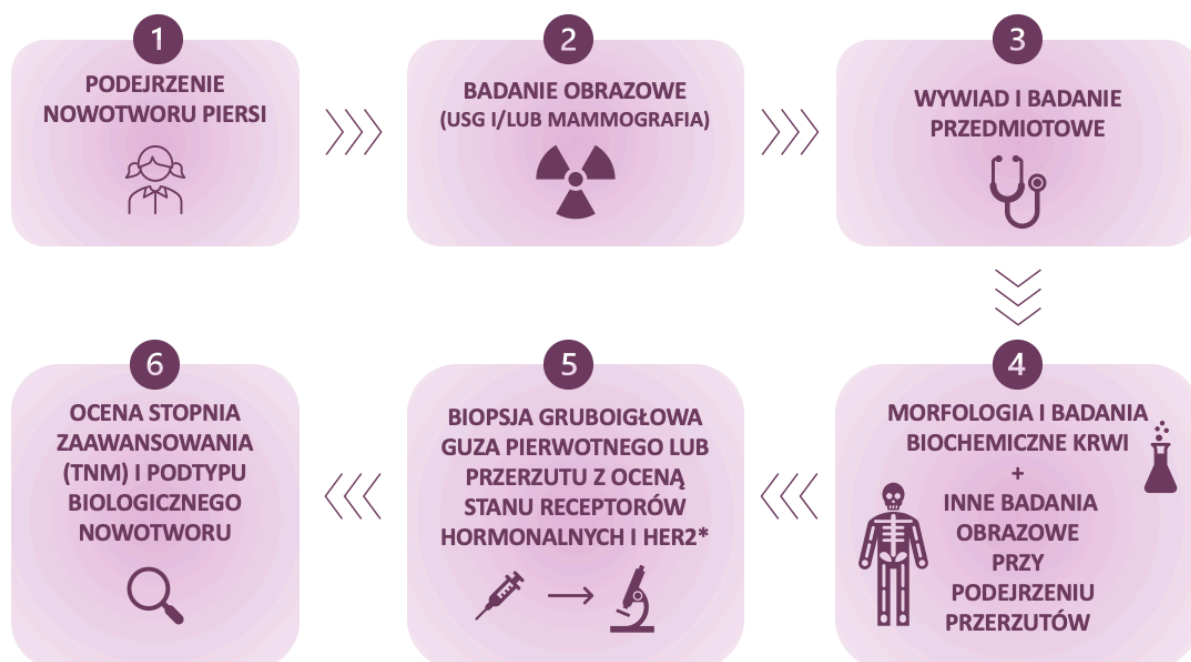
b) diagnostyka inwazyjna

Do badań inwazyjnych w których dochodzi do przerwania ciągłości naskórka należą badania krwi oraz biopsja [41]. Biopsję można podzielić na dwa rodzaje: biopsję cienkoigłową i gruboigłową. W biopsji cienkoigłowej za pomocą cienkiej igły pobiera się małą próbkę płynu lub tkanki. Biopsja gruboigłowa opiera się na wprowadzeniu grubej igły do guza i pobraniu małych wałeczków tkanki [43].

c) innowacyjne metody diagnostyczne

W przesiewowych badaniach obrazowych takich jak np. mammografia odnotowuje się znaczną część fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych wyników, toteż naukowcy nieustannie poszukują biomarkerów, które będą charakteryzowały się zarówno dobrą czułością jak i swoistością diagnostyczną oraz będą nieinwazyjne lub minimalnie inwazyjne. Obiecujące okazują się badania naukowców opierające się na wykrywaniu krążących antygenów nowotworowych, komórek nowotworowych, mikroRNA i pęcherzyków

zewnątrzkomórkowych we krwi obwodowej, płynie aspiracyjnym z tkanki gruczołu sutkowego, pocie, moczu i łzach, a także lotne związki organiczne w wydychanym powietrzu [41].



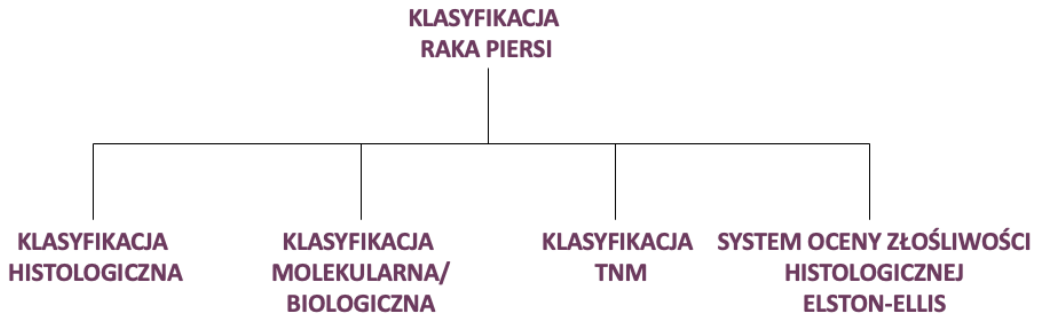
Rycina 4. Schemat diagnostyki raka piersi [44].

***Wyjaśnienie skrótów z ryciny 4:**

HER2 -ludzki receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (ang. human epidermal growth factor receptor 2).

1.6. Klasyfikacja nowotworu piersi

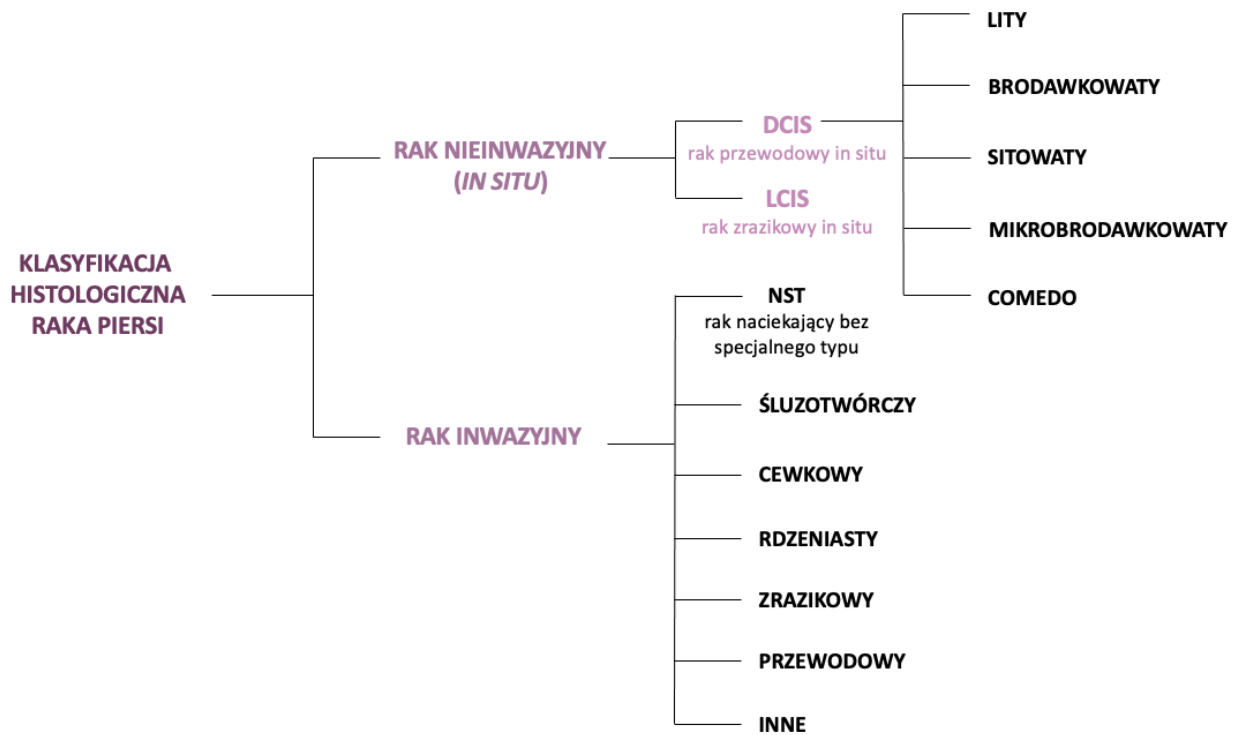
Biorąc pod uwagę, że rak piersi jest złożoną chorobą pod względem klinicznym, histologicznym, patologicznym oraz prognostycznym bardzo ważne jest opieranie sposobów leczenia i przewidywanie jego rezultatów na znanych i stosowanych w rutynowej praktyce klasyfikacjach. Dlatego kamieniem milowym okazał się dynamiczny rozwój na przykład technik biologii molekularnej które pozwoliły na wyodrębnienie klasyfikacji biologicznej raka piersi. Poniżej, rycina 5 prezentuje klasyfikacje raka piersi używane w praktyce onkologicznej.



Rycina 5. Klasyfikacje nowotworu piersi [45].

1.6.1. Klasyfikacja histologiczna

Na rycinie 6 przedstawiono uproszczoną nomenklaturę histologiczną nowotworu piersi zaproponowaną przez ekspertów z WHO.



Rycina 6. Uproszczona klasyfikacja histologiczna [46].

1.6.2. Klasyfikacja molekularna/biologiczna

Klasyfikacja molekularna raka piersi opiera się na 4 głównych wskaźnikach: receptor estrogenowy (ER, ang. oestrogen receptor), receptor progesteronowy (PR, ang. progesterone receptor), ludzki receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2, ang. human epidermal growth factor receptor 2) oraz wskaźnik proliferacji Ki-67. Stopień ekspresji tych markerów pozwala na wyróżnienie 5 głównych podtypów molekularnych raka piersi: luminalny A, luminalny B HER2 ujemny, luminalny B HER2 dodatni, nieluminalny HER2 dodatni oraz potrójnie ujemny [47]. Nowotwory piersi homonozależne tj. luminalny A i B rokują najlepiej oraz czas wolny od progresji choroby jest dłuższy, zaś najwyższy odsetek nawrotów odnotowuje się w podtypie nieluminalnym HER2 dodatnim oraz w potrójnie ujemnym [48]. Charakterystykę biologiczną nowotworów piersi przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka podtypów biologicznych raka piersi [47,48]

| | Luminalny A | Luminalny B HER2 ujemny | Luminalny B HER2 dodatni | Nieluminalny HER2 dodatni | Potrójnie ujemny |
|------------------|-------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|
| ER | +* | + | + | - | - |
| PR | + | każdy | każdy | - | - |
| HER2 | -* | - | + | + | - |
| Ki-67 | niski* | wysoki* | każdy | każdy | każdy |
| rokowanie | dobrze | średnie | średnie | średnie/złe | złe |

-, ujemny; +, dodatni; Ki-67 niski, < 20%; Ki-67 wysoki, >20%.

1.6.3. Klasyfikacja TNM

Klasyfikacja TNM w dużym skrócie pozwala na określenie jak duży jest nowotwór oraz czy występują przerzuty i jakie. Szczegółowe dane odnośnie do klasyfikacji TNM przedstawia tabela 2. Opiera się na trzech wskaźnikach:

- T – ang. tumour (określa rozmiar guza),
- N – ang. node (określa, czy występują przerzuty do węzłów chłonnych),
- M – ang. metastasis (określa, czy występują przerzuty odległe),

Tabela 2. Klasyfikacja kliniczna TNM [49].

| T | N | M |
|--|---|--|
| <p>Tx – guz pierwotny nie może zostać oceniony.</p> <p>T0 – guz pierwotny nie wykryty,</p> <p>Tis – rak <i>in situ</i>.</p> <p>T1 – guz pierwotny mniejszy niż 2 cm (w największym wymiarze),</p> <ul style="list-style-type: none"> - T1mi – guz nie większy niż 0,1 cm (mikronaciekanie), - T1a – guz większy niż 0,1 cm, ale nie większy niż 0,5 cm, - T1b – guz większy niż 0,5 cm, ale nie większy niż 1 cm, - T1c – guz większy niż 1 cm, ale nie większy niż 2 cm. <p>T2 – guz pierwotny większy niż 2 cm, ale mniejszy niż 5 cm (w największym wymiarze).</p> <p>T3 – guz pierwotny ponad 5 cm (w największym wymiarze).</p> <p>T4 – guz każdej wielkości naciekający ścianę klatki piersiowej i/lub skórę lub guzki satelitarne skóry,</p> <ul style="list-style-type: none"> - T4a – guz pierwotny naciekający ścianę klatki piersiowej (nie dotyczy mięśni piersiowych), - T4b – guz pierwotny z obrzękiem skóry (łącznie z objawem tzw. „skórki pomarańczy”) lub owrzodzenie skóry lub guzki satelitarne na skórze gruczołu piersiowego, - T4c – współistnienie cech T4a i T4b, - T4d – rak zapalny piersi. | <p>Nx – regionalne węzły chłonne nie mogą zostać ocenione.</p> <p>N0 – bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.</p> <p>N1 – regionalne, pachowe węzły chłonne ruchome, zmienione przerzutowo.</p> <p>N2 – przerzuty do nieruchomych lub tworzących pakiet węzłów chłonnych I i II piętra pachy po stronie guza lub przerzuty w węzłach piersiowych wewnętrznych po tej samej stronie (przy braku klinicznie podejrzanych węzłów pachowych),</p> <ul style="list-style-type: none"> - N2a – przerzuty w nieruchomych lub tworzących pakiety węzłach chłonnych I-II piętra pachy po stronie guza, - N2b – przerzuty w węzłach chłonnych piersiowych wewnętrznych guza przy braku podejrzanych węzłów pachowych. <p>N3 – przerzuty w węzłach (węzle) podobojczykowych po stronie guza (III piętro pachy) z zajęciem lub bez zajęcia węzłów piętra I i II pachy; przerzuty w węzłach (węzle) nadobojczykowych po stronie guza z zajęciem lub bez zajęcia węzłów chłonnych pachy lub piersiowych wewnętrznych,</p> <ul style="list-style-type: none"> - N3a – przerzuty w węzłach podobojczykowych po stronie guza, - N3b – przerzuty w węzłach piersiowych wewnętrznych i w węzłach pachowych, - N3c – przerzuty w węzłach nadobojczykowych po stronie guza. | <p>Mx – nie oceniono występowania przerzutów odległych,</p> <p>M0 – brak przerzutów odległych,</p> <p>M1 – przerzut odległy obecny.</p> |

Klasyfikacja stopnia zaawansowania klinicznego raka piersi wg klasyfikacji TNM przedstawiono w tabeli 3. Opiera się na tych 3 składowych (T, N, M) oraz pozwala wyodrębnić 1 z 5 stadiów choroby (0, I, II, III, IV) [49].

Tabela 3. Klasyfikacja stopnia zaawansowania klinicznego raka piersi wg klasyfikacji TNM (modyfikacja własna) [50].

| O | IA | IB | IIA | IIB | IIIA | IIIB | IIIC | IV |
|--------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|-----------------------|
| Tis N0 M0 | T1 N0 M0 | T0 N1mi M0 | T0 N1 M0 | T2 N1 M0 | T1 N2 M0 | T4 N0 M0 | każdy T N3 M0 | każdy T każdy N M1 |
| | | T1 N1mi M0 | T1 N1 M0 | T3 N0 M0 | T2 N2 M0 | T4 N1 M0 | | |
| | | | T2 N0 M0 | | T3 N1 M0 | T4 N2 M0 | | |
| | | | | | T3 N2 M0 | | | |

1.6.4. System oceny złośliwości histologicznej Elston-Ellis

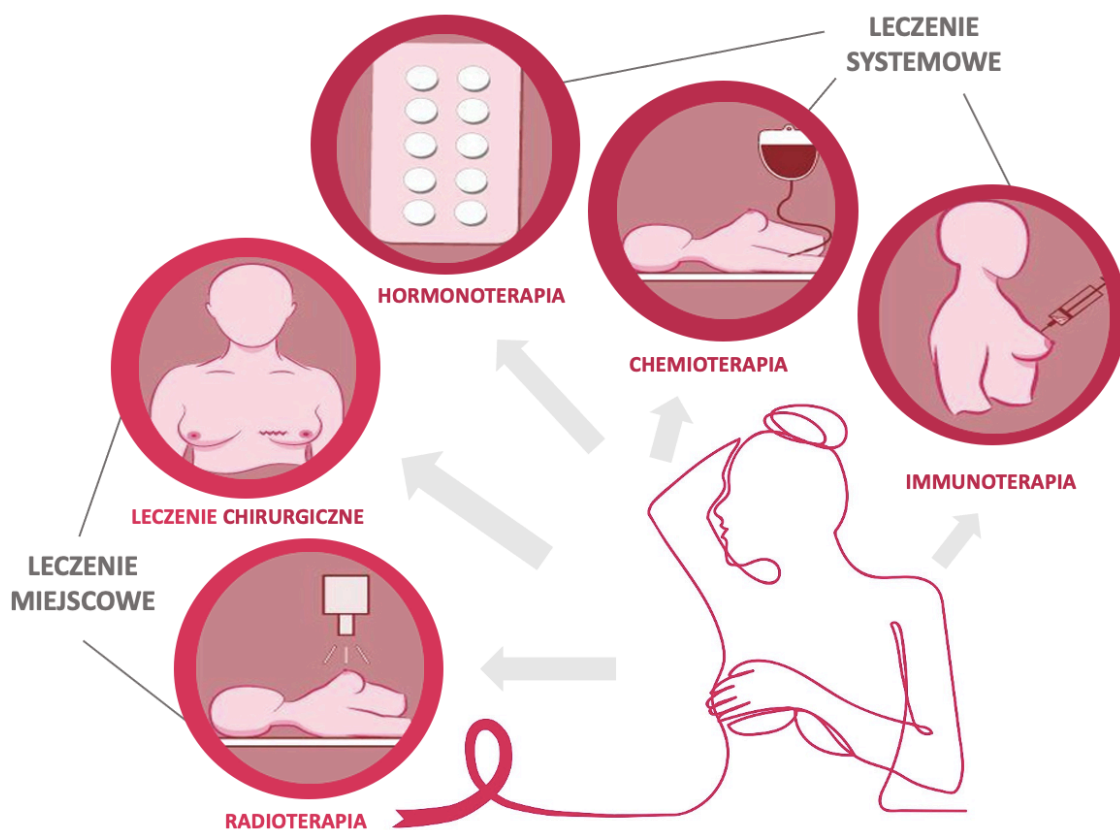
Każdy inwazyjny nowotwór piersi podlega ocenie stopnia złośliwości histologicznej Elston-Ellis, która jest zmodyfikowaną klasyfikacją Blooma i Richardsona znaną również jako system ocen Nottingham. Stopień złośliwości histologicznej (G, ang. grade) reprezentuje stopień zróżnicowania, który odzwierciedla podobieństwo komórek nowotworowych do prawidłowych komórek piersi i jest to półilościowa ocena trzech cech morfologicznych, którymi są: tworzenie cewek, pleomorfizm jądra i indeks mitotyczny. Jest to metoda stosunkowo prosta i tania oraz wymaga jedynie barwienia preparatów histopatologicznych hematoksyliną i eozyną. Sama ocena bazuje na numerycznym systemie punktacji 1–3 w każdej kategorii - tabela 4 [51,52].

Tabela 4. System oceny złośliwości histologicznej Elston-Ellis [52].

| Punkty | Architektura | Pleomorfizm jądra | Aktywność mitotyczna |
|---------------|---------------------|---|-----------------------------|
| 1 | >75% cewek | małe jądra, o jednorodnym kształcie i wielkości, | niewielka |
| 2 | 10-75% cewek | średniej wielkości lub duże jądra, o tym samym kształcie i rozmiarze, | średnia |
| 3 | <75% cewek | duże jądra, różniące się rozmiarem i kształtem. | duża |
| G1 | 3-5 punktów | dobre rokowanie, nowotwór dobrze zróżnicowany, | |
| G2 | 6-7 punktów | średnie rokowanie, nowotwór średnio zróżnicowany, | |
| G3 | 8-9 punktów | złe rokowanie, nowotwór słabo zróżnicowany, | |

1.7. Leczenie raka piersi

Leczenie raka piersi ma charakter wielodyscyplinarny, wymaga wysiłku i zaangażowania wielu specjalistów. Kluczową rolę w ustaleniu sposobu leczenia odgrywa rozpoznanie i stopień zaawansowania choroby nowotworowej. Ze względu na stopień oddziaływania na organizm chorego, leczenie można podzielić na miejscowe i systemowe. Leczenie miejscowe, do którego należy leczenie chirurgiczne i radioterapia działa na organizm pacjenta tylko w obszarze zajęтым przez guz. Zaś intencją leczenia systemowego (chemioterapia, hormonoterapia, immunoterapia) jest oddziaływanie na wszystkie komórki organizmu, aby wyeliminować wszystkie komórki nowotworowe. Ze względu na stopień zaawansowania choroby i wielkość guza podejmuje się decyzje o przedoperacyjnym (neoadjuwantowym) leczeniu ogólnoustrojowym lub uzupełniającym (adjuwantowym) [53]. Główne rodzaje leczenia raka piersi przedstawiono na rycinie 7.



Rycina 7. Sposoby leczenia raka piersi (modyfikacja własna) [54,55].

1.7.1 Leczenie neoadjuwantowe

Neoadjuwantowe, czyli przedoperacyjne leczenie raka piersi uznano za metodę terapeutyczną w przypadku wybranych raków piersi wysokiego ryzyka, guzów ≥ 2 cm oraz chorób miejscowo zaawansowanych (w tym początkowo niekwalifikujących się do resekcji). U pacjentek z dużymi guzami zastosowanie terapii neoadjuwantowej prawdopodobnie zmniejszy wielkość guza i może sprawić, że pacjentki będą kandydatkami do resekcji chirurgicznej, a niektóre pacjentki mogą zostać zakwalifikowane do operacji oszczędzającej pierś (BCS, ang. breast-conserving surgery) zamiast mastektomii. Podejście neoadjuwantowe pozwala na monitorowanie odpowiedzi na leczenie i przerwanie nieskutecznej terapii w przypadku progresji choroby, oszczędzając w ten sposób narażenie pacjenta na potencjalnie toksyczne skutki leczenia [56].

1.7.2. Leczenie adjuwantowe

Leczenie adjuwantowe zwane również uzupełniającym jest stosowane po pierwotnym leczeniu chirurgicznym i ma na celu zmniejszenie ryzyka nawrotu (zarówno miejscowego, jak i odległego) oraz poprawę przeżywalności. Leczenie uzupełniające, które obejmuje między innymi chemioterapię, hormonoterapię oraz immunoterapię jest stosowane w celu zmniejszenia ryzyka przerzutów odległych i poprawę przeżycia całkowitego. Radioterapia uzupełniająca jest stosowana, aby usunąć wszelkie lokalne złogi nowotworowe pozostałe po operacji, niezależnie od tego, czy była to mastektomia, czy operacja oszczędzająca pierś. Decyzja o zastosowaniu leczenia uzupełniającego jest złożona (biorąc pod uwagę zarówno czynniki prognostyczne, jak i związane z pacjentem) i jest podejmowana wspólnie z pacjentem po spotkaniu wielodyscyplinarnego zespołu [57].

1.7.3. Leczenie chirurgiczne

Celem leczenia chirurgicznego jest uzyskanie kontroli miejscowej nad nowotworem, zapobieganie regionalnym nawrotom i poprawa przeżycia pacjentów. Różne metody leczenia chirurgicznego obejmują głównie mastektomię prostą (z lub bez rekonstrukcji pierwotnej/opóźnionej) lub operacji oszczędzającej pierś. Diagnostyka węzła wartowniczego z lub bez jego usunięcia jest obecnie standardową procedurą [58]. Rycina 8 przedstawia graficznie typy operacji chirurgicznych piersi.

OPERACJA OSZCZĘDZAJĄCA PIERŚ

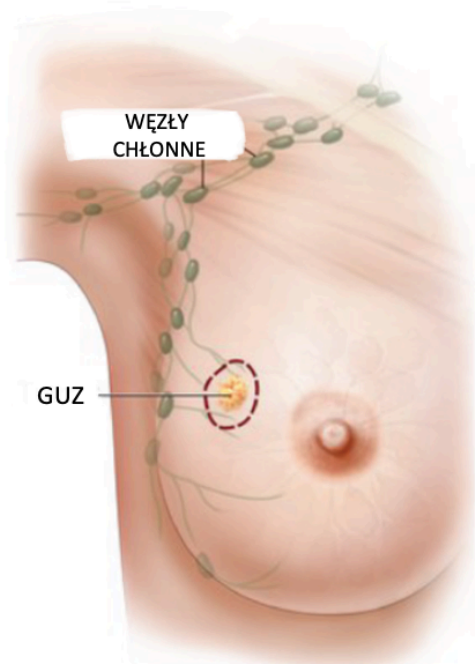
Chirurg powinien rozważyć wykonanie zabiegu oszczędzającego pierś, jeśli uważa, że guz można wyciąć w całości z odpowiednim marginesem zdrowych tkanek i zadowalającym dla pacjentki efektem kosmetycznym. W przypadku guzów większych niż 5 cm BCS rozważa się po uprzednim poddaniu pacjentki leczeniu neoadjuwantowemu. Jednakże uważa się, że to wielkość guza w stosunku do wielkości piersi oraz oczekiwania pooperacyjne pacjentek odgrywają największe znaczenie przy wyborze typu operacji [59].

MASTEKTOMIA PROSTA

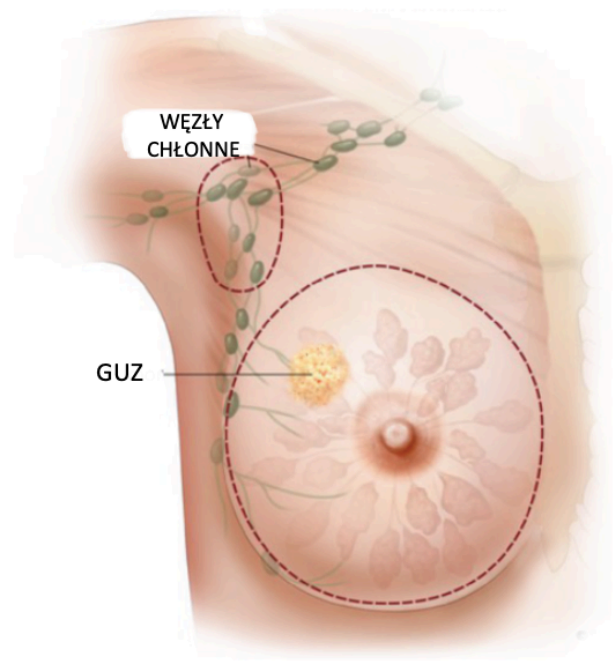
Mastektomia to zabieg chirurgiczny polegający na usunięciu części lub całej piersi. Mastektomia może być wskazana u pacjentek, u których choroba jest wielogniskowa

w obrębie piersi ze względu na objętość i umiejscowienie guza. Ponadto, pacjentki z guzami pierwotnymi większymi niż 5 cm oraz z zajęciem skóry i/lub ściany klatki piersiowej mogą odnieść większe korzyści z mastektomii (dłuższy okres przeżycia). Ten rodzaj leczenia jest wskazany u pacjentek z nawrotowym rakiem piersi. U pacjentek z zaawansowaną lokalnie chorobą nowotworową mastektomia w momencie rozpoznania może być przeciwwskazana. W takich przypadkach początkowo stosuje się leczenie neoadjuwantowe, które pozwala na zmniejszenie objętości guza i otwiera drzwi do operacji oszczędzającej [60].

OPERACJA OSZCZĘDZAJĄCA PIERŚ



MASTEKTOMIA PROSTA



Rycina 8. Typy operacji chirurgicznych piersi w modyfikacji własnej [61].

1.7.4. Radioterapia

Radioterapia uzupełniająca jest niezbędnym elementem leczenia raka piersi. Po operacji oszczędzającej pierś, radioterapia jest wskazana w przypadku raka przewodowego *in situ* (stadium 0), ponieważ zmniejsza ryzyko nawrotu o 50-60%. We wczesnym stadium raka inwazyjnego (stadium I-II) pozostaje standardowym postępowaniem po BCS. Zatwierdzoną alternatywą do konwencjonalnej radioterapii (25 x 2 Gy) jest hipofrakcjonowane napromieniowanie całej piersi dawką 15 x 2,67 Gy [62]. Częściowe napromienianie piersi można rutynowo stosować jako alternatywę dla napromieniania całej piersi, ale tylko

u wybranych i poinformowanych pacjentek. Napromienianie pach jest zalecane tylko wtedy, gdy nie wykonano chirurgicznego wycięcia węzłów pachowych oraz nie stwierdzono dodatniego wartowniczego węzła chłonnego. W przypadku węzłów pachowych zajętych przez nowotwór zaleca się napromienianie nad- i podobojczykowe. Jednoczesne podawanie chemioterapii jest niewskazane, zaś leczenie hormonalne można rozpocząć w trakcie radioterapii lub po niej [63]. Łoża po guzie stanowi główne miejsce nawrotu choroby po leczeniu zachowawczym. Niektóre badania wskazują, że podczas analizy histopatologicznej wycinków chirurgicznych stwierdzono obecność pozostałych komórek nowotworowych w odległości 15–20 mm wokół jamy resekcyjnej. Stąd w przypadku nowotworów o wyższym ryzyku nawrotu lub u pacjentek poniżej 50 roku życia zaleca się stosowanie na łożę po guzie tzw. boost - dodatkową dawkę promieniowania. Ponadto, trwają badania nad przydatnością stosowania śródoperacyjnej radioterapii na łożę po guzie, ze względu na możliwość jej natychmiastowego zastosowania oraz precyzyjne umiejscowienie w tkance zagrożonej nawrotem miejscowym [63,64].

1.7.5. Chemioterapia

Biorąc pod uwagę, że nowotwór piersi należy do heterogennej grupy chorób, wybór najskuteczniejszego schematu chemioterapii zależy od wielu czynników, takich jak rodzaj nowotworu, jego stadium, zaawansowanie kliniczne, lokalizacja i podtyp molekularny. Leki chemioterapeutyczne można sklasyfikować na podstawie ich sposobu działania, ponieważ działają na różne cele komórkowe, wpływając na wiele szlaków komórkowych, co może prowadzić do zatrzymania cyklu komórkowego i/lub indukcji apoptozy [64]. U pacjentów z grupy wysokiego ryzyka na ogół zaleca się chemioterapię ogólnoustrojową. Istnieje kilka standardowych schematów chemioterapii, zazwyczaj zawierających zarówno antracyklinę, jak i taksany. Pacjentkom z rakiem piersi z przerzutami do węzłów chłonnych na ogół zaleca się chemioterapię ze względu na gorsze rokowanie w porównaniu z pacjentami z rakiem piersi bez przerzutów do węzłów chłonnych [53].

Tabela 5. Wybrane leki chemioterapeutyczne stosowane w raku piersi i ich sposób działania [65].

| Grupa leków | Lek | Mechanizm działania |
|--|----------------------------|--|
| Inhibitory mitozy (taksany) | Docetaksel, Paklitaksel | Działają poprzez odwracalne wiązanie się z beta-tubuliną, hamując wzrost i wydłużanie mikrotubul, prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego i indukowania apoptozy. |
| Antymetabolity (inhibitory nukleozydowe) | Kapecytabina | Prekursor 5-fluorouracylu. Inhibitor nukleozydów, konkuruje z replikacją i transkrypcją DNA i RNA. |
| Antracykliny | Doksorubicyna, Epirubicyna | Inhibitor topoizomerazy II, zakłóca naprawę DNA, a także wytwarzanie wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, które uszkadzają błony i białka. |

1.7.6. Hormonoterapia

Terapia hormonalna jest główną opcją leczenia nowotworów piersi wykazujących ekspresję receptorów hormonalnych (luminalnych A i B) u kobiet w okresie przed- i pomenopauzalnym. Receptor estrogenowy odgrywa istotną rolę w pośredniczeniu i transkrypcji szerokiego zakresu genów odpowiedzialnych za proliferację, inwazję oraz angiogenezę w raku piersi. Zatem luminalny rak piersi wymaga do wzrostu dużej ilości estrogeny, dlatego w terapii hormonalnej estrogen jest albo blokowany przed wiązaniem się z receptorami przez antyestrogeny (tamoksifen), albo jego synteza jest ograniczona przez zastosowanie inhibitorów aromatazy (anastrozol, letrozol) [65].

- a) **Antyestrogeny** to selektywne modulatory receptorów estrogenowych (SERM, ang. selective estrogen receptor modulators), które działają poprzez blokowanie receptorów estrogenowych i zmniejszenie wiązania z estrogenem. **Tamoksyfen** to niesteroidowa pochodna trifenylloetyleny, stosowana jest jako leczenie pierwszego rzutu u pacjentek z luminalnym rakiem piersi w okresie przed- i pomenopauzalnym. Zapobiega wiązaniu się estrogenów w komórkach nowotworowych (antagonista estrogenowy), symulując funkcje estrogenopodobne w kościach, wątrobie i macicy (agonista estrogenopodobny). W komórkach raka piersi tamoksyfen konkuruje

z estrogenem i wiąże się z ER, zapobiegając jego aktywacji i tym samym wpływając na sygnalizację estrogenową [65].

b) Inhibitory aromatazy blokują enzym aromatazę, enzym cytochromu p450, który katalizuje syntezę estrogenów z prekursorów androgenów. Aromatyzacja jest głównym mechanizmem syntezy estrogenów u kobiet po menopauzie. U tych kobiet inhibitory aromatazy blokują transformację androgenów nadnerczowych do estrogenów w tkankach obwodowych (w tym w tkance tłuszczowej, mięśniach, wątrobie, płucach, mózgu, a także piersi), co skutkuje niewykrywalnym poziomem estrogenów w osoczu. Z tego powodu inhibitory aromatazy stosuje się głównie w populacji kobiet po menopauzie. Obecnie w praktyce klinicznej stosowana jest ich trzecia generacja. Substancje dzielą się na niesteroidowe pochodne triazoli i inhibitory steroidowe. **Letrozol** i **Anastrozol** to niesteroidowe pochodne triazolu a steroidem jest **Exemestan** [65].

1.7.7. Immunoterapia

Od czasu, gdy stało się oczywiste, że rak piersi należy do nowotworów immunogennych, immunoterapia stała się elementem strategii terapeutycznej przeciwko temu nowotworowi [66]. Leczenie z zastosowaniem immunoterapii stosuje się głównie w przypadku nowotworów z nadekspresją HER2, które stanowią około 20% wszystkich nowotworów piersi. HER2 jest podklasą rodziny receptorów wzrostu naskórka, zwykle występującą w postaci nieaktywnego monomeru i aktywowaną przez dimeryzację HER3 (receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu typu 3). Po aktywacji, część kinazy tyrozynowej receptora aktywuje kaskadę reakcji fosforylacji, która modyfikuje rozwój nowotworu poprzez wpływ na proliferację komórek, angiogenezę, przerzuty i apoptozę.

a) **Trastuzumab** to pierwsze rekombinowane humanizowane przeciwciało monoklonalne IgG1 stosowane w leczeniu raku piersi HER2+. Wiąże się z domeną receptora kinazy tyrozynowej występującej w cząsteczce HER2 oraz hamuje dimeryzację receptorów, zmniejszając w ten sposób siłę szlaków sygnalizacyjnych kinaz MAP i PI3. Zwiększa także aktywność inhibitora CDK p27kipl, który hamuje kompleks cyklina E/Cdk2, co w konsekwencji prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1, co skutkuje uruchomieniem procesu apoptozy. Zapobiega angiogenezie nowotworu poprzez

hamowanie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor). Trastuzumab promuje również odpowiedź immunologiczną poprzez aktywację zależnej od przeciwciał cytotoksyczności komórkowej limfocytów NK [65].

- b) **Pertuzumab** to kolejne przeciwciało monoklonalne opracowane w celu redukcji oporności komórkowej na trastuzumab. Wiąże się z domeną II HER2, powodując blokadę heterodimeryzacji HER2-HER3, w przeciwieństwie do trastuzumabu, który zapobiega dimeryzacji HER2 jedynie poprzez wiązanie się z domeną IV. Prowadzi do zapobiegania całej kaskadzie reakcji i indukuje reakcje immunologiczne w podobny sposób jak trastuzumab. Jest lekiem silniejszym i nie ma działania kardiotoxycznego, co czyni go korzystniejszą opcją w leczeniu podtypów raka piersi z nadekspresją HER2 [65].
- c) **Ado-trastuzumab emtanzyna** jest najnowszym członkiem rodziny terapii immunologicznych. Jest to koniugat przeciwciało-lek składający się z dwóch części: przeciwciała monoklonalnego trastuzumabu i części leku cytotoksycznego. Chociaż przeciwciało jest wysoce selektywne i specyficzne wobec komórek nowotworowych, odpowiada za dostarczanie leku cytotoksycznego (inhibitor tubuliny DM1) do komórki. Gdy przeciwciało monoklonalne zwiąże się z HER2, indukuje endocytozę komórkową kompleksu, który jest rozkładany przez enzymy proteolityczne w lizosomie. Po uwolnieniu do komórki DM1 oddziałuje z mikrotubulami, zapobiegając ich polimeryzacji. Prowadzi to do zatrzymania cyklu komórkowego i indukcji apoptozy, a także przerwania wewnątrzkomórkowego transportu HER2 [65].

2. Tkanka tłuszczowa

Tkanka tłuszczowa to jedyna w swoim rodzaju dynamiczna tkanka, która odgrywa kluczową rolę fizjologiczną w utrzymaniu zdrowia i homeostazy [67]. To nie tylko tkanka magazynująca tłuszcz, ale pełni również rolę ochronną. Jest to ważny narząd wydzielania wewnętrznego, w którym są zarówno generowane jak i integrowane sygnały wysyłane z różnych tkanek [68]. Liczne badania wskazują, że w niektórych stanach patologicznych nieprawidłowa przebudowa tkanki tłuszczowej może powodować rozregulowanie produkcji różnych adipocytokin i związków biologicznie aktywnych, prowadząc do zaburzeń w narządach metabolicznych [67].

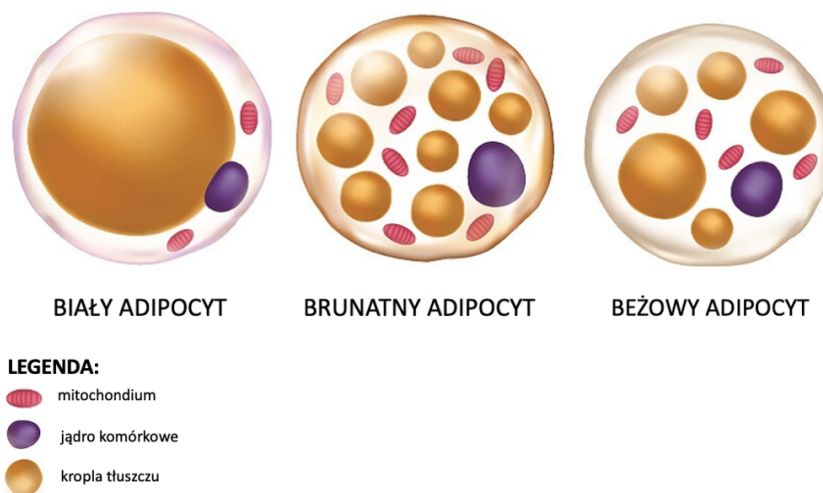
2.1. Budowa i rodzaje tkanki tłuszczowej

Tkanka tłuszczowa jest zbudowana z adipocytów. Historycznie, definicja komórki tłuszczowej jako adipocytu była jedynie związana z zawartością lipidów w cytoplazmie komórki a pomijała niestety jej funkcje [69]. Obecnie uważa się, że tkanka tłuszczowa stanowi kolejny narząd endokryny organizmu. Adipocyty są rozproszone po całym organizmie będąc zawieszane na włóknach kolagenowych. Tkankę tłuszczową budują również: frakcja komórek macierzystych SVR (ang. stromal vascular fraction), fibroblasty, makrofagi, komórki śródbłonna naczyniowego, leukocyty oraz preadipocyty [70]. Tradycyjnie, wyróżnia się dwa rodzaje tkanki tłuszczowej: białą tkankę tłuszczową (WAT, ang. white adipose tissue) i brązową tkankę tłuszczową (BAT, ang. brown adipose tissue) [69]. Nowe dowody wskazują na istnienie jeszcze jednego rodzaju tkanki tłuszczowej – beżowej (BeAT, ang. beige adipose tissue [67]. Na rycinie 9 przedstawiono morfologie trzech typów adipocytów.

- a) **Biała tkanka tłuszczowa** jest zbudowana z białych adipocytów, które są związane luźną, unaczynioną i unerwioną tkanką łączną. W białych adipocytach duża „jednokomorowa” kropelka lipidów zajmuje ponad 90% objętości komórki. Dodatkowo występuje cienka warstwa cytoplazmy zawierająca inne organelle. WAT pełni rolę zarówno endokrynną jak i metaboliczną (lipogeneza, utlenianie kwasów tłuszczowych i lipoliza). W okresach postu WAT dostarcza organizmowi „paliwa”, przechowując i uwalniając cząsteczki o wysokiej energii, zwłaszcza kwasy tłuszczowe [67].
- b) **Brunatna tkanka tłuszczowa** jest zbudowana z brązowych adipocytów. Brązowy kolor wynika z dużej gęstości mitochondriów i sieci naczyniowej. Każdy brązowy adipocyt ma

kontakt z trzema lub większą liczbą naczyń. W niektórych przypadkach pojedyncza komórka tłuszczowa może otaczać cały obwód ściany naczyń włosowatych swoimi wypustkami cytoplazmatycznymi, co podkreśla ogromne znaczenie funkcjonalnych powiązań brązowych adipocytów z naczyniami [69]. W porównaniu do białych adipocytów, które zawierają pojedynczą kropelkę lipidów, brązowe zawierają wiele mniejszych kropelek i znaczną liczbę mitochondriów [67]. BAT jest również silnie unerwiony. W BAT występują zarówno nerwy mielinowe, jak i niemylinowe [69]. Główną rolą BAT jest utrzymanie stałej temperatury ciała poprzez wytwarzanie ciepła [67].

- c) **Beżowa tkanka tłuszczowa** jest zbudowana z beżowych adipocytów, które mogą się pojawić w białej tkance tłuszczowej pod wpływem stymulacji termogenicznej, co określa się jako brązowienie WAT [71]. Adipocyty beżowe wykazują cechy zarówno adipocytów białych, jak i brązowych. Beżowe adipocyty są indukowane przez różne bodźce, takie jak ekspozycja na zimno, ćwiczenia i agoniści receptorów β -adrenergicznych i wykazano, że odgrywają rolę w regulacji wydatku energetycznego i funkcji metabolicznych. Beżowe adipocyty wytwarzają kilka cytokin regulujących metabolizm energetyczny, w tym interleukina-6 (IL-6, ang. interleukin 6), która jak wykazano, sprzyja brązowieniu białych adipocytów, nasila termogenezę oraz odgrywa rolę w regulacji metabolizmu glukozy i wrażliwości na insulinę. Inną cytokiną wytwarzaną przez beżowe adipocyty jest czynnik martwicy nowotworu (TNF- α , ang. tumour necrosis α), który jak wykazano, reguluje brązowienie białych adipocytów, poprawia wrażliwość na insulinę oraz odgrywa rolę w regulacji stanu zapalnego i funkcji odpornościowych. Beżowe adipocyty wytwarzają czynnik wzrostu fibroblastów 21 (FGF21, ang. fibroblast growth factor 21), który, jak wykazano, poprawia metabolizm glukozy i wrażliwość tkanek na insulinę [72].



Rycina 9. Morfologia trzech typów komórek tłuszczowych (modyfikacja własna) [73].

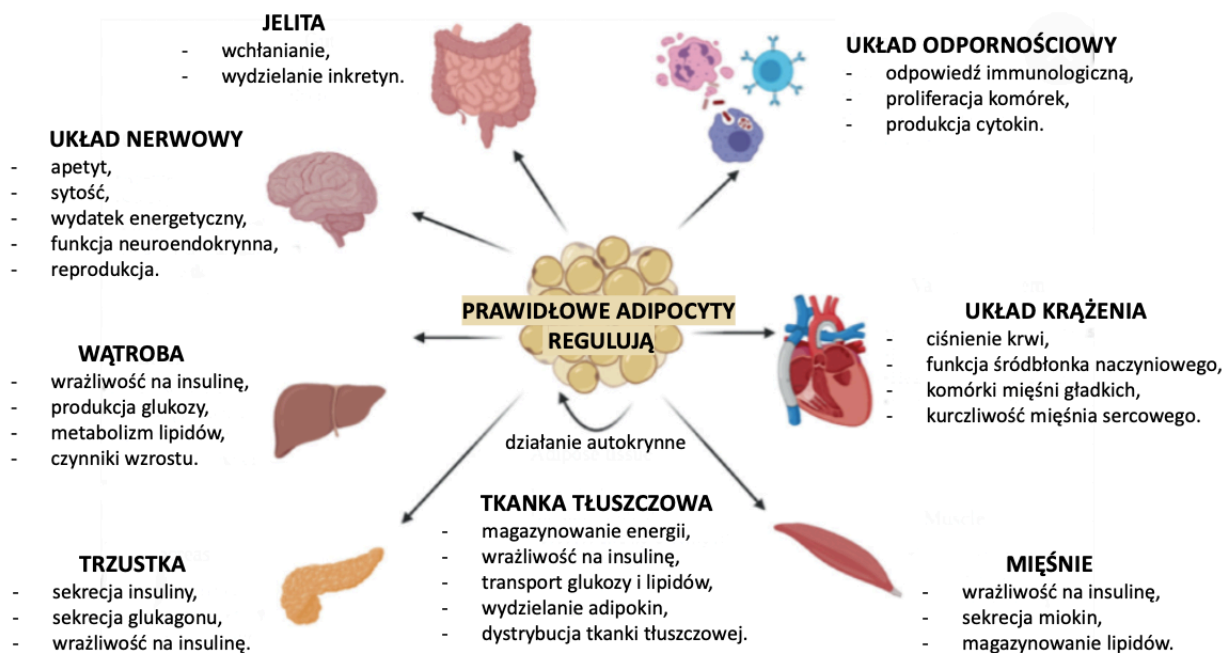
2.2. Funkcje tkanki tłuszczowej

Tkanka tłuszczowa nie jest już uważana jedynie za tkankę magazynującą energię. Aktywność tkanki tłuszczowej wpływa na metabolizm całego organizmu. Będąc kolejnym narządem wydzielania wewnętrznego, tkanka tłuszczowa jest odpowiedzialna za syntezę i wydzielanie związków biologicznie czynnych. Są one odpowiedzialne za szereg procesów, takich jak kontrola spożycia składników odżywczych (np. leptyna), kontrola wrażliwości na insulinę i mediatory procesów zapalnych (np. TNF- α , IL-6, rezystyna, wisfatyna, adiponektyna) [74]. Wybrane adipocytokiny i ich funkcje przedstawiono w tabeli 6. Funkcję tkanki tłuszczowej przedstawiono na rycinie 10.

Tabela 6. Wybrane adipocytokiny wydzielane przez tkankę tłuszczową do krwioobiegu i ich funkcje [74].

| Związek | Funkcja |
|--------------|--|
| leptyna | m.in. przesyła sygnały do mózgu dotyczące zapasów tkanki tłuszczowej, odpowiada za regulację apetytu i wydatku energetycznego, zwiększenie stanu zapalnego |
| adiponektyna | odgrywa rolę ochronną w patogenezie cukrzycy typu 2 i chorób układu krążenia, zwiększenie wrażliwości tkanek na insulinę, zmniejszenie stanu zapalnego |
| rezystyna | hipotetyczna rola w insulinooporności, |
| PAI-1 | inhibitor układu fibrynolitycznego poprzez hamowanie aktywacji t-PA, |

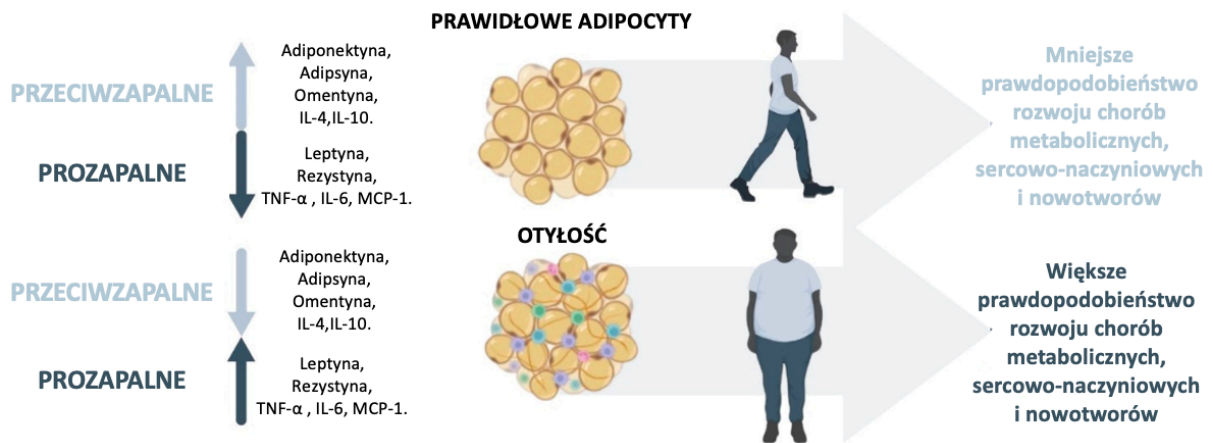
| | |
|---------------|--|
| TNF- α | wpływa na sygnalizację receptora insuliny, co jest możliwą przyczyną rozwoju insulinooporności w otyłości, |
| IL-6 | prozapalna, metabolizm lipidów i glukozy, regulacja masy ciała, |
| VEGF | stymulacja angiogenezy. |



Rycina 10. Funkcje tkanki tłuszczowej (modyfikacja własna) [75].

2.3. Dysfunkcje tkanki tłuszczowej

W zdrowej tkance tłuszczowej, wzrasta poziom adipokin przeciwzapalnych, a stężenie adipokin prozapalnych zmniejsza się. W otyłości jest odwrotnie, co zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych. Zostało to przedstawione na rycinie 11. Zmiana profilu adipokin powoduje zmianę homeostazy glukozy, wrażliwości na insulinę, lipolizę i utlenianie kwasów tłuszczowych, działając na różne tkanki, takie jak wątroba, mięśnie, trzustka i samą tkankę tłuszczową. Ponadto, może również przyczyniać się do innych powikłań związanych z otyłością, takich jak niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby, zespół policystycznych jajników i zespół bezdechu sennego. Powiązane z procesem nowotworem adipokiny mogą modulować wzrost nowotworu, angiogenezę, przerzuty, oporność na apoptozę i lekooporność poprzez interakcję z różnymi szlakami sygnałowymi, takimi jak np. NF- κ B, JAK/STAT [72].



Rycina 11. Zachowanie adipokin w zależności od aktywności tkanki tłuszczowej (modyfikacja własna) [72].

2.4. Rola tkanki tłuszczowej w procesie nowotworzenia

Otyłość wiąże się ze zwiększonym ryzykiem i agresywnością wielu typów nowotworów [76]. Szacuje się, że 40% zgonów spowodowanych nowotworami wynika z otyłości [77]. Dowody na to, że tkanka tłuszczowa wpływa na stopień agresywności nowotworu stale rosną. Uważa się, że podczas progresji nowotworu komórki nowotworowe wchodzi w symbiozę metaboliczną z sąsiadującą tkanką tłuszczową. Dojrzałe adipocyty dostarczają adipokin i lipidów komórkom nowotworowym, podczas gdy komórki zrębowe i odpornościowe z tkanki tłuszczowej naciekają nowotwory i lokalnie wydzielają czynniki parakryne w mikrośrodowisku guza [76]. Wraz ze zwiększoną akumulacją tkanki tłuszczowej pojawiają się zaburzenia metaboliczne i insulinooporność, a zwiększone stężenie insuliny i glukozy w organizmie sprzyja rozwojowi wielu nowotworów, w tym raka okrężnicy i endometrium. Otyłość wiąże się również ze strukturalną przebudową tkanki tłuszczowej, w tym zwiększonym miejscowym zwłóknieniem i zakłóconą angiogenezą, które przyczyniają się do rozwoju i progresji nowotworów [78]. Wiele typów nowotworów żołądka, piersi, okrężnicy, nerek i jajnika rozwija się w anatomicznym sąsiedztwie tkanki tłuszczowej. Podczas interakcji z komórkami nowotworowymi adipocyty ulegają odróżnicowaniu do preadipocytów lub są przeprogramowywane w adipocyty związane z nowotworem (CAA ang. cancer-associated adipocytes). CAA wydzielają adipokiny, które stymulują adhezję, migrację i inwazję komórek nowotworowych. Komórki nowotworowe i CAA również podlegają dynamicznej wymianie metabolitów. W szczególności CAA uwalnia kwasy tłuszczowe poprzez lipolizę, które są

następnie przenoszone do komórek nowotworowych i wykorzystywane do produkcji energii poprzez β -oksydację [79].

2.4.1. Wpływ tkanki tłuszczowej na rozwój nowotworu piersi

W gruczole sutkowym przewody nabłonkowe, struktury produkujące mleko, są otoczone tkanką tłuszczową sutka [80]. Zarówno nabłonek gruczołu sutkowego jak i tkanka tłuszczowa sutka podlegają przebudowie w trakcie ciąży, laktacji i inwolucji. Uważa się, że tkanka tłuszczowa silnie promuje wzrost komórek nabłonkowych, zapewniając wsparcie strukturalne i sygnały regulacyjne [81]. Powszechnie znany jest negatywny wpływ tkanki tłuszczowej na rozwój nowotworu piersi. Uważa się, że mechanizmy biologiczne, które łączą otyłość z nowotworem piersi, opierają się w dużej mierze na nadmiernej ekspozycji gruczołów sutkowych na nadmierne wydzielanie estrogenów, mediatorów prozapalnych - cytokin i czynników wzrostu [82]. W tkance tłuszczowej u osób otyłych dochodzi do niedotlenienia czego efektem jest zwiększone wydzielanie leptyny i *VEGF* oraz zmniejszone wydzielanie adiponektyny (zmiana profilu adipokin). Konsekwencją tego zjawiska jest naciek prozapalnych komórek odpornościowych, które między innymi zwiększają liczbę preadipocytów, aktywują szlak czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) w celu podtrzymania prozapalnego środowiska. Ekspansja preadipocytów powoduje zwiększanie wydzielania IL-6, IL-8, chemokina MCP-1 (chemokina CCL2, białkowy chemoatraktant monocytów (ang. monocyte chemoattractic protein-1), chemokina CCL5 (ang. C-C motif chemokine ligand 5) i *VEGF*, które dodatkowo napędzają szlak NF- κ B. Szlak NF- κ B oraz IL-6 stymulują ekspresję aromatazy w adipocytach i fibroblastach zrębu piersi zwiększając miejscową produkcję estrogenów [83]. Ponadto, w tkance tłuszczowej zachodzi ekspresja TNF- α i IL-6, które upośledzają aktywację receptora dla insuliny pośrednicząc w insulinooporności, która napędza rozwój raka piersi [84]. W badaniach obserwuje się zwiększoną częstość nawrotów i śmiertelność z powodu nowotworu u osób z podwyższonym stężeniem leptyny i obniżonym stężeniem adiponektyny [82].

2.5. Leptyna

2.5.1. Budowa strukturalna i biologiczne funkcje

Leptyna jest wielofunkcyjnym hormonem wydzielanym przez adipocyty o masie 16 kDa. Zatem stężenie leptyny w krążeniu odzwierciedla ilość energii zgromadzonej w tkance tłuszczowej i jest skorelowany ze stopniem otyłości. Jest kluczowa dla przyjmowania pokarmu, kontroli masy ciała oraz bilansu energetycznego. Leptyna składa się z 167 aminokwasów i kodowana jest przez gen *ob* zlokalizowany na chromosomie 7. Pierwsze 21 aminokwasów pełni funkcję peptydu sygnałowego i ulegają rozszczepieniu zanim krążąca forma białka (146 aminokwasów) zostanie uwolniona do krwiobiegu [85]. Leptyna wykazuje podobną budowę do innych białek z rodziny cytokin, należących do grupy cytokin powszechnie zwanych adipocytokinami lub adipokinami [86]. Dla białek z rodziny cytokin charakterystyczna jest budowa składająca się z 4 helis α (A-B-C-D). Leptyna zawiera unikalne wiązanie dwusiarczkowe, które łączy dwie cysteiny w helisach C i D, co wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla jej integralności strukturalnej i stabilności [85,87]. Leptyna charakteryzuje się głównie działaniem plejotropowym ze względu na istnienie różnych receptorów dla leptyny (znanych jako LEPR-a (ang. leptin receptor a), LEPR-b, LEPR-c, LEPR-d, LEPR-e i LEPR-f) [88]. Postrzeganie leptyny tylko jako hormonu regulującego homeostazę energetyczną organizmu ewoluowało i obecnie wiadomo, że reguluje również rozwój płodu, płodność (tj. ruchliwość plemników, dojrzewanie komórek jajowych), laktację, rozwój kości, hematopoezę, odpowiedź immunologiczną, angiogenezę i proliferację wielu różnych typów komórek, w tym komórek tkanki piersi [89]. Ponadto, leptyna działa jako mediator prozapalny w zaburzeniach immunologiczno-metabolicznych związanych z otyłością, takich jak cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe lub autoimmunologiczne oraz nowotwory, regulując hematopoezę, limfopoezę i mielopoezę na poziomach rozwoju, proliferacji, działania przeciwapoptotycznego i dojrzewania [90]. Jej szerokie działanie związane jest z narządami, w których jest wytwarzana tj. łożysko, mięśnie szkieletowe, żołądek oraz komórki przysadki mózgowej [91].

2.5.2. Zależność między leptyną a nowotworzeniem

Działanie pleiotropowe leptyny, jej wpływ na organizm jest szeroko analizowanym zagadnieniem przez naukowców. Ostatnie doniesienia wskazują, że bierze udział w występowaniu i rozwoju niektórych nowotworów tj. raka okrężnicy, tarczycy, przełyku endometrium trzustki i piersi [92]. Receptory dla leptyny są szeroko rozpowszechnione w organizmie, ostatnie doniesienia naukowców wykazały ich obecność również w niektórych typach nowotworów. Wyniki badań wykazały proonkogenny wpływ leptyny, obejmujący stymulację proliferacji komórek, regulację apoptozy, samoodnowę i zmniejszoną odpowiedź na leczenie raka piersi. Leptyna może działać poprzez następujące szlaki: wiązanie własnego receptora (ObR) lub interakcję z innymi mediatorami, o których wiadomo, że są zaangażowane w rozwój raka piersi (np. ER α , czynniki wzrostu (VEGF) i cytokiny zapalne – IL-6, IL-1, TNF- α) [93]. Leptyna poprzez regulację uwalniania neuroprzekazników z podwzgórza, odgrywa ważną rolę w rozwoju wielu różnych nowotworów złośliwych. Jednym z dobrze poznanych mechanizmów jest szlak JAK/STAT, który promuje progresję cyklu komórkowego poprzez zwiększenie ekspresji kinazy cyklino zależnej Cdk2 i cykliny D1, indukując w ten sposób hiperfosforylację, a następnie inaktywację inhibitora cyklu komórkowego Rb [94]. Ponadto obecność nadmiaru estrogenów ma szczególne znaczenie w nowotworach hormonozależnych m.in. raku piersi, gdzie leptyna odgrywa szczególne znaczenie wzmacniając sygnalizację estrogenową. Zwiększa ekspresję genu aromatazy lub działa poprzez bezpośrednią transaktywację receptora estrogenowego typu α [93]. Stąd, uważa się leptynę bierze udział we wzroście i inwazji komórek raka piersi podwyższone stężenie leptyny wiąże się z agresywnością raka piersi i złym rokowaniem [82]. Leptyna szczególnie u osób otyłych indukuje wytwarzanie cytokin prozapalnych TNF- α i IL-6 przez makrofagi i przesuwają równowagę limfocytów T w kierunku fenotypu TH1. Ten stan zapalny o niewielkim nasileniu zwiększa ryzyko chorób związanych z otyłością i nowotworów. Ponadto, leptyna moduluje sygnalizację PI3K/AKT3, sygnalizację ERK1/2, zwiększa ekspresję białek antyapoptotycznych takich jak XIAP, promuje czynniki proangiogenne (VEGF) i zwiększa ekspresję czynnika 1 α indukowanego hipoksją (HIF-1 α), który promuje przetrwanie, proliferację i migrację komórek nowotworowych [95].

2.6. Adiponektyna

2.6.1. Budowa strukturalna i biologiczne funkcje

Adiponektyna jest cytokiną wydzielaną przez tkankę tłuszczową. Składa się z 244 aminokwasów i charakteryzuje masą cząsteczkową 28 kDa. Hormon ten został po raz pierwszy zidentyfikowany w 1995 roku, a gen kodujący to białko zlokalizowany jest na chromosomie 3 [96]. Zawiera cztery różnicowalne domeny: sekwencję sygnałową na końcu aminowym i region zmienny, nieposiadający homologii z żadnym innym znanym białkiem, domenę kolagenową i domenę kulistą na końcu karboksylowym. W osoczu białko krąży głównie w dwóch postaciach: heksamerów o stosunkowo niskiej masie cząsteczkowej i większych struktur multimerycznych o dużej masie cząsteczkowej [97]. Adiponektyna ma dwa główne receptory, AdipoR1 i AdipoR2, z którymi wiąże się, aby kontrolować homeostazę energetyczną, reakcje zapalne, wrażliwość na insulinę i proces spalania tłuszczu [96]. Ponadto, podobnie jak białka układu dopełniacza, może oddziaływać z komórkami odpornościowymi, takimi jak makrofagi i monocyty. W makrofach hamuje wytwarzanie i wydzielanie TNF- α i IL-6 oraz tworzenie komórek piankowatych, zapobiega także różnicowaniu prekursorów monocytów i przyleganiu samych monocytów do ścian naczyń i stymuluje produkcję cytokin przeciwzapalnych przez monocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne [98]. Uważa się ją za „cząsteczkę spalającą tłuszcz” ponieważ pod jej wpływem dochodzi do utlenienia kwasów tłuszczowych w mięśniach [97]. Obniżenie adiponektyny ma bezpośredni związek z zmniejszoną wrażliwością na insulinę, rozwojem otyłości brzusznej i zmianami profilu lipidowego (niskie stężenie lipoprotein o dużej gęstości (HDL, ang. high density lipoprotein)). U osób otyłych stężenie adiponektyny jest odwrotnie skorelowany z ilością tkanki tłuszczowej [99].

2.6.2. Zależność między adiponektyną a nowotworzeniem

Adiponektyna, jedna z najważniejszych adipokin wydzielanych przez tkankę tłuszczową ma działanie przeciwnowotworowe, w tym antyproliferacyjne, przeciwmigracyjne i proapoptotyczne [82]. Przez swoją funkcję ochronną w nowotworach i chorobach związanych z otyłością jest nazywana „adipokiną anioła stróża” [100]. Jedną z funkcji adiponektyny jest hamowanie proliferacji śródbłonna naczyniowego stymulowaną czynnikiem wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2, ang. *fibroblast growth factor 2*) przez co zmniejsza migrację

komórek śródbłonna naczyniowego indukowaną przez VEGF [101]. Adiponektyna hamuje szlaki Wnt i Akt poprzez zwiększenie czynnika hamującego Wnt-1 (WIF1) w komórkach linii MDA-MB-231 (potrójnie ujemny nowotwór piersi o silnie agresywnym charakterze), co prowadzi do supresji nowotworu [102]. Ostatnie badania wskazują, że adiponektyna indukuje autofagię cytotoksyczną co prowadzi do hamowania rozwoju raka piersi, poprzez modulowanie osi STK11/LKB1 (kinaza serynowo-treoninowa 11 (STK11), kinaza wątrobowa B1 (LKB1)) [103]. Ponadto, adiponektyna indukuje supresję nowotworu poprzez zmniejszenie puli lipidów komórkowych, głównie poprzez hamowanie syntazy kwasów tłuszczowych (FAS, ang. fatty acid synthase) i aktywację sirtuiny 1 (SIRT-1), która będzie sprzyjać apoptozie in vivo i in vitro [104]. W 2009 roku pierwszy raz opisano wpływ adiponektyny na rozwój przerzutów nowotworowych. Ponadto, wykazano, że adiponektyna hamuje adhezję, migrację i inwazję komórek raka piersi, głównie poprzez zwiększenie ekspresji LKB1, genu supresorowego nowotworu, który aktywuje oś AMPK-S6K [105]. Guzy piersi powstające u kobiet z niskim poziomem adiponektyny w surowicy mogą mieć bardziej agresywny fenotyp (duży rozmiar guza, wysoki stopień zaawansowania histologicznego i zwiększony potencjał do tworzenia przerzutów) [106].

2.7. Stosunek leptyny do adiponektyny (LAR)

Leptyna i adiponektyna wykazują przeciwstawne funkcje, które zostały przedstawione w tabeli 7. Stosunek leptyny do adiponektyny (LAR, ang. leptin-to-adiponectin ratio) jest czułym markerem ogólnoustrojowego stanu zapalnego i czynnikiem predykcyjnym chorób kardiometabolicznych i nowotworowych [107]. Uważa się go za wskaźnik identyfikujący dysfunkcyjną tkankę tłuszczową. LAR uznaje się za lepszy marker insulinooporności i zespołu metabolicznego niż stężenie samej leptyny czy adiponektyny w surowicy [108]. Niektórzy naukowcy proponują wykorzystywanie LAR jako wskaźnika miażdżycowego u pacjentów z cukrzycą typu 2 [109]. Biorąc pod uwagę, że leptyna i adiponektyna wykazują działanie przeciwstawne w komórkach istotne jest zachowanie równowagi między nimi. Zmiany stosunku leptyny do adiponektyny ukazane poprzez zwiększenie LAR łączą otyłość z rakiem piersi. Zwiększony LAR wiąże się z większym ryzykiem powstawania raka piersi, endometrium, jelita grubego, trzustki oraz prostaty. Stąd, w niektórych badaniach wykorzystuje się LAR jako potencjalny marker diagnostyczny, estymator ryzyka w nowotworach związanych z otyłością [110]. Uważa się, że LAR może stanowić czynnik predykcyjny odpowiedzi na leczenie.

W przypadku raka jajnika stwierdzono, że im mniejszy LAR przed leczeniem, tym lepsza odpowiedź na chemioterapię [111].

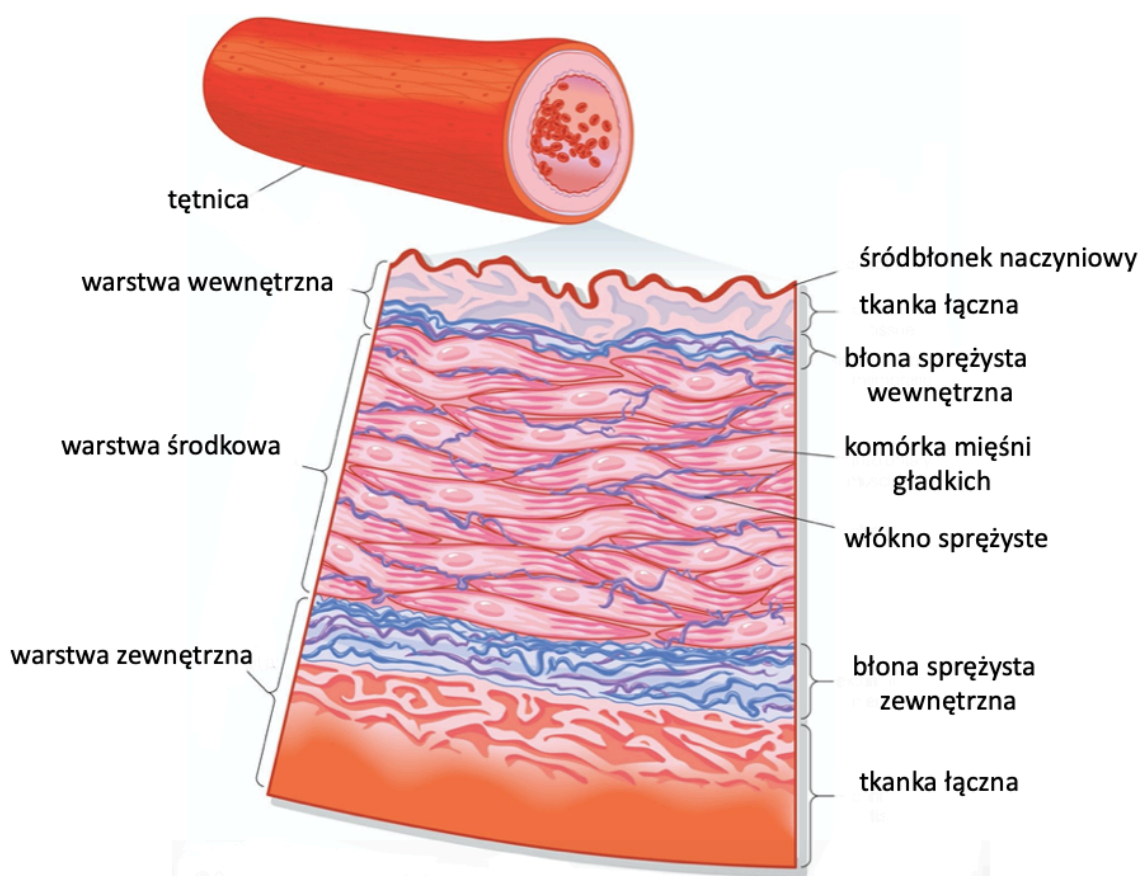
Tabela 7. Wybrane cechy i funkcje adiponektyny i leptyny [99].

| Cechy i funkcje | Adiponektyna | Leptyna |
|-------------------------|---|--|
| Receptory | AdipoR1 and AdipoR2 | transport (ObRa, ObRb i ObRc) i sygnalizacja (ObRd, ObRe i ObRf) |
| Wydzielanie/ synteza | Syntetyzowany głównie przez adipocyty i kardiomiocyty. Jego syntezę opisano w komórkach szpiku kostnego, komórkach mięśni szkieletowych i hepatocytach. | Jest wydzielany przez adipocyty białej tkanki tłuszczowej oraz w małych ilościach także przez łożysko, jajnik i błonę śluzową żołądka. |
| Funkcje | <ul style="list-style-type: none"> - zwiększa insulinowrażliwość, - reguluje metabolizm glukozy i tłuszczów, - zapobiega miażdżycy, - przeciwzapalna. | <ul style="list-style-type: none"> - promuje insulinooporność, - reguluje przyjmowanie pokarmu, masę ciała, wydatek energetyczny, - działanie promiażdżycowe, - w stanie zapalnym działa bezpośrednio na makrofagi zwiększając ich aktywność fagocytarną i produkcję cytokin prozapalnych. |

3. Śródbłonek naczyniowy

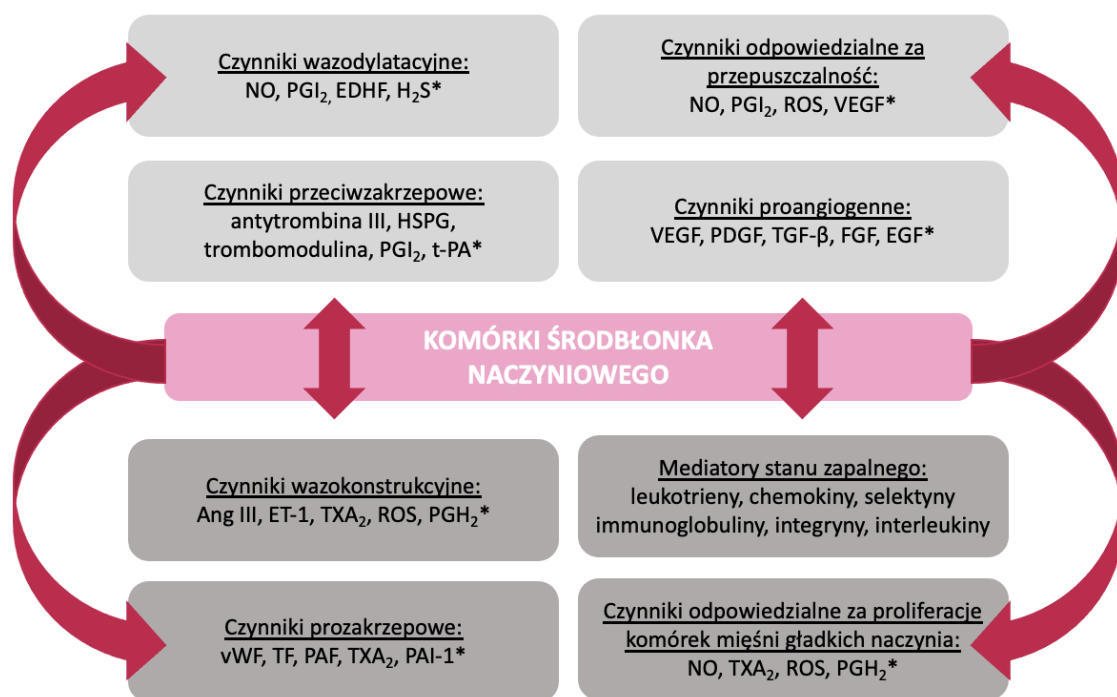
3.1. Budowa i funkcja śródbłonka naczyniowego

Śródbłonek naczyniowy to warstwa komórek wyścielejących wewnętrzną warstwę naczyń krwionośnych od serca po najmniejsze naczynia włosowate [112]. Dokładną lokalizację śródbłonka naczyniowego przedstawiono na rycinie 12. Komórki śródbłonka naczyniowego (EC, ang. endothelial cells) zakotwiczone są w błonie podstawnej o grubości 80 nm, razem tworząc błonę naczyniową, hemokompatybilną powierzchnię szacowaną na 3000–6000 m² [113]. Wynika to z obecności związanych z błoną receptorów dla wielu cząsteczek, w tym białek, cząstek transportujących lipidów, metabolitów i hormonów, a także poprzez specyficzne białka i receptory łączące, które regulują interakcje komórka-komórka i komórka-macierz komórkowa [114].



Rycina 12. Lokalizacja śródbłonka naczyniowego na przekroju przez ścianę tętnicy (modyfikacja własna) [115].

Uważa się, że śródbłonek naczyniowy to narząd wydzielania wewnętrznego a nie tylko bariera między krwią a tkankami. Główne funkcje i substancje wydzielane przez śródbłonek naczyniowy zostały przedstawione na rycinie 13. Aktywnie kontroluje stopień zwężenia i rozluźnienia naczyń oraz wynacynienie substancji rozpuszczonych, płynów, makrocząsteczek i hormonów, a także elementów morfotycznych krwi. Poprzez kontrolę napięcia naczyń ECs regulują regionalny przepływ krwi. Kierują także komórki zapalne na obszary wymagające naprawy lub obrony przed infekcjami. Ponadto ECs odgrywają ważną rolę w kontrolowaniu płynności krwi, adhezji i agregacji płytek krwi, aktywacji leukocytów, adhezji i transmigracji leukocytów. Utrzymują także ściśle równowagę między procesami krzepnięcia a fibrynolizy i odgrywają główną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej a także uczestniczą w procesie tworzenia nowych naczyń [113].



Rycina 13. Ważne funkcje i substancje wydzielane przez śródbłonek naczyniowy (modyfikacja własna) [116,117].

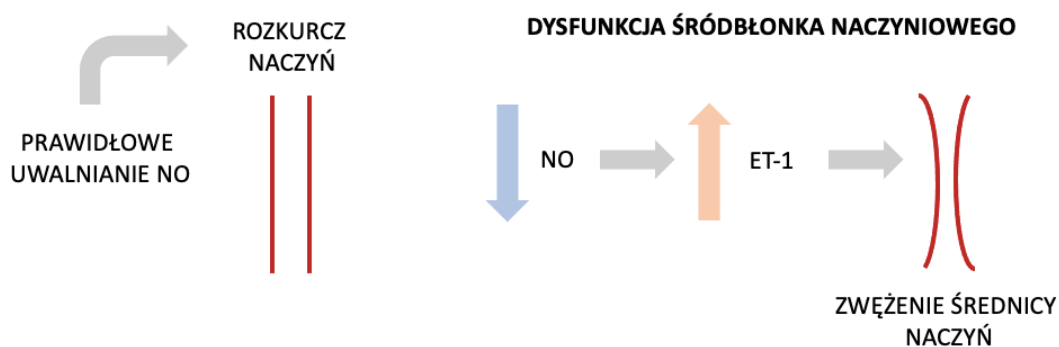
*** Wyjaśnienie skrótów z Ryciny 13:**

Ang II- angiotensyna II (ang. angiotensin II), EDHF- śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (ang. endothelial hiperpolarisation factor), ET-1- endotelina 1 (ang. endothelin 1), FGF- czynnik wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor), H₂S- siarkowodór (ang. hydrogen sulfide), HSPG- siarczan heparanu (ang. heparan sulfate), NO- tlenek azotu (ang. nitric oxide), PAF- czynnik aktywujący płytki krwi (ang. platelet activator factor), PAI-1- inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (ang. plasminogen activator

inibitor 1), PDGF- płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet-derived growth factor), PGH2- prostaglandyna H2 (ang. prostaglandin H2), PGI2- prostacyklina (ang. prostacyclin), ROS- reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species), TF- czynnik tkankowy (ang. tissue factor), t-PA- tkankowy aktywator plazminogenu (ang. tissue plasminogen activator), TXA2- tromboksan 2 (ang. thromboxane 2), TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. transforming growth factor beta), VEGF- czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor), vWF- czynnik von Willebranda (ang. von Willebrand factor),

3.2. Definicja uszkodzenia komórek śródbłonna naczyniowego

Uszkodzenie komórek śródbłonna naczyniowego charakteryzuje się przesunięciem równowagi działania w kierunku zwężenia średnicy naczyń, stanu prozapalnego i prozakrzepowego [118]. Do uszkodzenia śródbłonna naczyniowego dochodzi w wyniku zmniejszonej biodostępności NO poprzez nadmierną generację wolnych rodników tlenowych - rycina 14 [119]. Skutkuje to zwężeniem średnicy naczyń oraz zwiększoną przepuszczalnością śródbłonna, która umożliwia przedostawanie się komórek, które powinny pozostać we krwi poza naczynia krwionośne do sąsiednich tkanek. Istnieje kilka czynników, które mogą zwiększać liczbę wolnych rodników tlenowych w organizmie, w tym otyłość, palenie tytoniu, brak snu, ostre infekcje bakteryjne, wysokie spożycie węglowodanów prostych, nasyconych kwasów tłuszczowych oraz narażenie na metale ciężkie i zanieczyszczenia powietrza. W przypadku dysfunkcji śródbłonna naczyniowego zdolność do pełnienia jednej lub więcej z tych funkcji jest zaburzona. Ponadto, uważa się, że dysfunkcja śródbłonna naczyniowego odgrywa główną rolę w rozwoju miażdżycy, angiogenezy w przypadku nowotworów, chorób zakaźnych i udaru mózgu [118]. Aspekty uszkodzenia śródbłonna naczyniowego przedstawiono na rycinie 15.



Rycina 14. Mechanizm dysfunkcji śródbłonna naczyniowego (rycina własna).



Rycina 15. Aspekty uszkodzenia śródbłonna naczyniowego (modyfikacja własna) [120].

* **Wyjaśnienie skrótu z Ryciny 15:**

eNOS –śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (ang. endothelial nitric oxide synthase)

3.3. Biomarkery uszkodzenia komórek śródbłonna naczyniowego

Śródbłonek naczyniowy stanowi barierę między krwią a tkankami. To strategiczne położenie wskazuje na jego rolę w kontrolowaniu hemostazy, stanu zapalnego i średnicy naczyń, a jego stan jest jednocześnie przyczyną i skutkiem chorób. Uszkodzenie komórek śródbłonna naczyniowego prowadzi do zmiany jego fenotypu reprezentowanego przez markery uszkodzenia komórek śródbłonna naczyniowego [121]. Markery powierzchniowe to białka wyrażane na powierzchni komórek, które często służą jako markery określonych typów komórek. Dostosowany do śródbłonna naczyniowego, biomarker powinien być specyficzny pod względem aktywacji/dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, wskazując na leżącą u jego podstaw patofizjologię choroby, powtarzalny u pacjentów i populacji, skorelowany z aktywnością choroby w czasie, a także powinien stanowić uzupełnienie oceny klinicznej. Istnieje wiele różnych cząsteczek, które zostały określone jako biomarkery naczyniowe lub śródbłonkowe, do których należą między innymi selektyna P, selektyna E, czynnik von Willebranda, tkankowy aktywator plazminogenu oraz inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 [122].

3.3.1. Rozpuszczalna forma selektyny P

Selektyna P to białko transbłonowe, którego gen znajduje się na chromosomie 1. Jest obecna w ziarnistościach alfa płytek krwi i ciałkach Weibela-Palade'a komórek śródbłonna naczyniowego [123,124]. Selektyna P pośredniczy w toczeniu się komórek krwi na powierzchni

śródbłónka naczyniowego i inicjuje przyłączanie leukocytów do płytek krwi, komórek śródbłónka naczyniowego i innych leukocytów w miejscach uszkodzenia i stanu zapalnego. Jest to możliwe, dzięki występowaniu specyficznych ligandów dla selektyny P [125]. Głównym ligandem dla selektyny P jest ligand glikoproteinowy-1 selektyny P (PSGL-1, ang. P-selectin glycoprotein ligand-1), który ulega ekspresji praktycznie na wszystkich leukocytach. PSGL-1 występuje na neutrofilach, eozynofilach, limfocytach, monocytach i płytkach, gdzie sprzyja wiązaniu i adhezji komórek. Wraz z selektyną P odgrywają ważną rolę w hemostazie i powstawaniu zakrzepicy [123]. Oddziaływanie selektyny P z PSGL-1 indukuje zwiększenie stężenie czynnika tkankowego, cytokin prozapalnych w leukocytach i wytwarzanie cząsteczek prokoagulacyjnych, przyczyniając się w ten sposób do powstania stanu prozakrzepowego. Ponadto, selektyna P oddziałuje z sulfatydami płytek krwi, stabilizując w ten sposób początkowe agregaty płytek utworzone przez mostki GPIIb/IIIa-fibrynogen. Selektyna P bierze także udział w interakcjach płytka-płytką, czyli agregacji płytek krwi, która jest głównym czynnikiem wywołującym zakrzepicę tętniczą [124]. Rozpuszczalna forma selektyny P (sP-selektyna, ang. soluble P-selectin) występuje we krwi i krąży u zdrowego człowieka w stężeniach ok. 100 ng/ml. Podwyższony poziom rozpuszczalnej formy selektyny P jest głównym czynnikiem predykcyjnym zdarzeń sercowo-naczyniowych związanych z obrotem płytek krwi oraz ich aktywacją i funkcją. Selektyna P odgrywa kluczową rolę w chorobach związanych z urazami i zakrzepicą tętniczą. Zwiększoną ekspresję selektyny P obserwuje się w chorobie wieńcowej, ostrym zawale mięśnia sercowego, udarze mózgu i chorobach tętnic obwodowych. Patogeneza zakrzepicy u chorych na nowotwory jest związana z dysfunkcją komórek śródbłónka naczyniowego, aktywnym udziałem leukocytów oraz zwiększoną liczbą i aktywnością płytek krwi [125]. Po aktywacji i degranulacji płytek ekspresja selektyny P na powierzchni trombocytów jest przejściowa, natomiast uwalniana jest jej rozpuszczalna postać, którą można wykryć w surowicy. Dlatego ocena rozpuszczalnej formy selektyny P jest lepszym wskaźnikiem aktywacji trombocytów w porównaniu z ekspresją jej formy transbłonowej [126].

3.3.2. Rozpuszczalna forma selektyny E

Selektyna E jest glikoproteiną błonową, cząsteczką adhezji komórkowej, która jest obecna na komórkach śródbłónka naczyniowego po pobudzeniu przez czynnik tkankowy, interleukinę 1 i bakteryjny lipopolisacharyd [127]. Podobnie jak inne selektyny, odgrywa

ważną rolę w procesie zapalnym i adhezji komórek nowotworowych do śródbłonka naczyniowego. E-selektyna pośredniczy w toczeniu się leukocytów na powierzchni śródbłonka naczyniowego i dlatego bierze udział w rekrutacji neutrofilii, monocytów i limfocytów T do ognisk zapalnych. Ekspresja selektyny E na powierzchni komórki osiąga swoje maksimum po 4 godzinach od indukcji cytokinami prozapalnymi. Następnie jest stopniowo internalizowana przez endocytozę i rozkładana w lizosomach tak, że po 24 godzinach nie jest już wykrywalna. Rozpuszczalna forma selektyny E (sE-selektyna, ang. soluble E-selectin) powstaje w wyniku rozszczepienia enzymatycznego lub gdy aktywowane komórki śródbłonka naczyniowego złuszczały uszkodzone części swojej powierzchni. Uważa się, że stężenie sE-selektyny jest bezpośrednio skorelowane z ekspresją na powierzchni komórki, stąd można ją wykorzystać jako marker aktywacji śródbłonka naczyniowego i narzędzie kliniczne w zarówno w diagnostyce jak i jako czynnik prognostyczny i predykcyjny nowotworów, ostrych procesów zapalnych i zakrzepicy [128]. Uznaje się, że poziom sE-selektyny odzwierciedla stan aktywacji komórek śródbłonka. Co ciekawe, wykazano, że sE-selektyna w surowicy zachowuje zdolność przylegania do swojego liganda na krążących leukocytach, zmniejszając w ten sposób zdolność komórek odpornościowych do mobilizacji w miejscu zapalenia. Ten mechanizm stanowi samoograniczający się proces mający na celu uniknięcie szkodliwego stanu zapalnego spowodowanego niekontrolowaną rekrutacją leukocytów w tkankach [129].

3.3.3. Znaczenie selektyn w chorobach nowotworowych

Podczas progresji nowotworu selektyny umożliwiają interakcję między komórkami nowotworowymi a składnikami krwi, w tym płytkami krwi, komórkami śródbłonka naczyniowego i leukocytami [130]. Interakcje komórek nowotworowych są możliwe dzięki częstej obecności determinantów węglowodanowych – ligandów selektyny na powierzchni komórek nowotworowych [131]. Nowotwory charakteryzuje nieprawidłowa sialilacja glikoprotein i glikolipidów, co zostało powiązane z opornością na leki, inwazyjnością nowotworu i rozsiewem naczyniowym prowadzącym do przerzutów. Hipersialilacja komórek nowotworowych jest w dużej mierze wynikiem nadekspresji sialilotransferaz (ST, ang. sialyltransferase). Jednym z ważnych mechanizmów, dzięki któremu nadekspresja ST przyczynia się do zwiększonego fenotypu przerzutowego, jest wytwarzanie ligandów selektyny [132]. Stopień ekspresji ligandu selektyny przez komórki nowotworowe jest wyraźnie powiązany z progresją i złym rokowaniem u pacjentów chorych na raka [131].

Ponadto, selektyny przyczyniają się do tworzenia i utrzymywania tzw. mikrośrodowiska nowotworu. Komórki nowotworowe wraz z pozostałymi składnikami krwi aktywują lokalną niszę przerzutową w wyniku której dochodzi do zwiększonej ekspresji selektyny E. Wywołuje to zwiększoną ekspresję chemokiny CCL5, która rekrutuje monocyty do miejsca wynacznienia przerzutowego [130]. Ponadto, uważa się, że krążąca postać selektyny E nasila adhezję i migrację tych komórek niezależnie od śródbłonna naczyniowego oraz ułatwia progresję nowotworu i przerzuty. Najprawdopodobniej rola sE-selektyny w rozsiewaniu komórek nowotworowych jest związana z przyczepianiem się i diapedezą komórek nowotworowych przez ścianę naczynia [133]. Dużo mówi się o roli selektyny P w procesie karcynogenezy u chorych na raka piersi, szczególnie na etapie progresji do fenotypu inwazyjnego i powstawania ognisk przerzutowych. Co więcej, uważa się, że podwyższona sP-selektyna w surowicy kobiet z nowotworem piersi może odzwierciedlać biologiczny potencjał nowotworu do tworzenia przerzutów [126]. U pacjentów chorujących na nowotwór charakterystyczne jest występowanie tzw. krążących komórek nowotworowych, które są zdolne do tworzenia przerzutów. Krążące komórki nowotworowe dostają się do krwioobiegu, gdzie dzięki swoistym ligandom dla selektyny P dochodzi do opłaszczania tych komórek przez płytki krwi. Ten swoisty płaszcz ochronny z płytek, chroni krążące komórki nowotworowe przed siłami ścinającymi oraz atakującymi je komórkami odpornościowymi. Ponadto, umożliwia wiązanie się z fibrynogenem wywołując w ten sposób mikroskrzepy wewnątrznacyniowe oraz zapewnia czynniki stymulujące wzrost, dzięki którym dochodzi do proliferacji komórek nowotworowych [134]. W badaniach stwierdzono wyższe stężenia sP-selektyny w surowicy pacjentek z rakiem surowiczym endometrium o niekorzystnym rokowaniu w porównaniu z rakiem endometrioidalnym, choć różnica nie była istotna statystycznie. Rak surowiczy endometrium zazwyczaj wiąże się z niekorzystnym rokowaniem, tendencją do głębszego zajęcia mięśniówki macicy, przerzutów i nawrotów, co może sugerować związek pomiędzy podwyższonym stężeniem selektyny P w surowicy a niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi [126].

4. Hemostaza

Hemostaza fizjologiczna jest tradycyjnie definiowana jako złożony szlak biologiczny, którego celem jest zatrzymanie wycieku krwi z uszkodzonych naczyń żylnych i tętniczych, a jednocześnie zapobieganie nadmiernemu lub nieuzasadnionemu krzepnięciu krwi, gdy te struktury nie są uszkodzone. Hemostazę dzieli się na hemostazę pierwotną i hemostazę wtórną, przy czym pierwsza z nich obejmuje głównie zwężenie naczyń i wytworzenie wstępnego i labilnego czopu płytkowego, druga zaś jest reprezentowana przez „krzepnięcie krwi”. Ostatnim etapem hemostazy jest fibrynoliza, którego mechanizm polega na rozpuszczaniu włókniaka po całkowitym zatrzymaniu krwawienia [135].

4.1. Hemostaza pierwotna

Hemostaza pierwotna jest to proces, którego celem jest powstanie stabilnego czopu płytkowego zamykającego szczelinę powstałą w ścianie naczynia w wyniku jego uszkodzenia [136]. Obejmuje interakcję między płytkami krwi, białkami adhezyjnymi znajdującymi się w macierzy podśródbłonkowej (w tym kolagenem i czynnikiem von Willebranda) oraz krążącym fibrynogenem [137]. Hemostazę pierwotną można podzielić na trzy etapy: adhezja płytek krwi do ściany naczynia, aktywacja płytek krwi i tworzenie agregatów płytek krwi [136]. Schemat przebiegu hemostazy pierwotnej został przedstawiony na rycinie 16.

ADHEZJA PŁYTEK KRWI

W wyniku uszkodzenia ściany naczynia dochodzi do kontaktu krążącej krwi z macierzą podśródbłonkową, która jest bogata w białka adhezyjne tj. czynnik von Willebranda, kolagen typu 1 i typu 4, fibronektynę, trombospondynę, lamininę i witronektynę [137]. Przebieg procesu adhezji płytek jest uzależniony od wielkości naprężenia ścinającego. W warunkach niskiej szybkości ścinania, które są charakterystyczne dla układu żylnego i wnętrza przedsiionków, płytki krwi mogą reagować bezpośrednio z cząsteczkami kolagenu, lamininy i witronektyny poprzez glikoproteinę VI (GP-VI). W układzie tętniczym panują warunki dużego naprężenia ścinającego, więc udział czynnika von Willebranda staje się niezbędny, aby nastąpiła adhezja płytek [136]. Czynnikiem von Willebranda łączy się z odsłoniętymi strukturami podśródbłonkowymi tj. z kolagenem i umożliwia zatrzymanie płytek krwi w szybko płynącej

krwi poprzez interakcję jego domeny A1 (vWFA1) z receptorem glikoproteiny płytkowej Iba (GPIIb). To wiązanie inicjuje łączenie płytek z miejscem uszkodzenia, ale ma krótki okres półtrwania i nie zapewnia nieodwracalnej adhezji [138]. Po uwięzieniu płytek, dochodzi do oddziaływania kolagenu z GP-VI i integryną $\alpha 2\beta 1$. Stabilna adhezja następuje poprzez wiązanie integryn z ich odpowiednimi ligandami na ścianie naczynia [139].

AKTYWACJA PŁYTEK KRWI

Do aktywacji płytek krwi prowadzą interakcje pomiędzy receptorami powierzchniowymi płytek krwi (np. GPIIb, integrynami) i ich ligandami (np. vWF, kolagenem, fibrynogenem/fibryną, fibronektyną itp.). Ponadto, po uszkodzeniu naczyń następuje aktywacja układu krzepnięcia, który generuje najsilniejszy czynnik aktywacji płytek krwi – trombinę [140]. Aktywacja płytek krwi skutkuje zmianą kształtu płytek krwi, uwolnieniem ziarnistości płytek krwi i zmianą konformacyjną receptora GPIIb/IIIa, który umożliwia wiązanie się z fibrynogenem i vWF, prowadząc do agregacji płytek krwi [137].

AGREGACJA PŁYTEK KRWI

Agregacja płytek krwi rozpoczyna się w momencie ich aktywacji, wyzwalając receptor GPIIb/IIIa, który przyłącza się do vWF i fibrynogenu. Każda aktywowana płytka wydłuża rzekome pseudopodia, zbijając się i agregując. Agregacja płytek krwi sprzyja tworzeniu się pierwotnego czopu płytkowego [140]. Pierwotny czop płytkowy jest stabilizowany na drodze hemostazy wtórnej.

4.2. Hemostaza wtórna

Hemostaza wtórna jest to szereg reakcji, które wspólnie prowadzą do rozszczepienia rozpuszczalnego fibrynogenu przez trombinę i wytworzenia stabilnej, usieciowanej fibryny w miejscu urazu. Wtórna hemostaza zasadniczo dzieli się na 2 szlaki: wewnątrzpochodny i zewnątrzpochodny, które razem spotykają się w jednym punkcie tworząc wspólny szlak prowadzący do wytworzenia siatki fibryny stabilizującej czop płytkowy. Schemat przebiegu szlaki zewnątrzpochodnego, wewnątrzpochodnego i drogi wspólnej przedstawia rycina 16. Niedawno, pojawiła się nowa teoria, zwana komórkowym modelem krzepnięcia, która

sugeruje skomplikowane interakcje między płytkami krwi, ścianami naczyń i układem krzepnięcia i lepiej opisuje procesy krzepnięcia zachodzące in vivo [141,142].

SZLAK WEWNĄTRZPOCHODNY

Szlak wewnątrzpochodny rozpoczyna się aktywacją czynnika XII (zymogenu, inaktywowanej proteazy serynowej), który po ekspozycji na kolagen śródbłonkowy (odstąpiony w momencie uszkodzenia naczynia) staje się czynnikiem XII aktywnym (XIIa) tj. aktywowaną proteazą serynową. Czynniki XIIa działa jak katalizator aktywujący czynnik XI do czynnika XIa. Następnie czynnik XIa aktywuje czynnik IX do czynnika IXa. Czynniki IXa pełni dalej rolę katalizatora przekształcającego czynnik X w czynnik Xa. Nazywa się to kaskadą. Kiedy każdy czynnik zostanie aktywowany, w kolejnych krokach aktywuje się wiele innych czynników. W miarę przesuwania się w dół kaskady stężenie tego czynnika we krwi wzrasta. Na przykład stężenie czynnika IX jest większe niż czynnika XI. Szlak wewnątrzpochodny mierzy się klinicznie jako czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT, ang. activated partial thromboplastin time) [143].

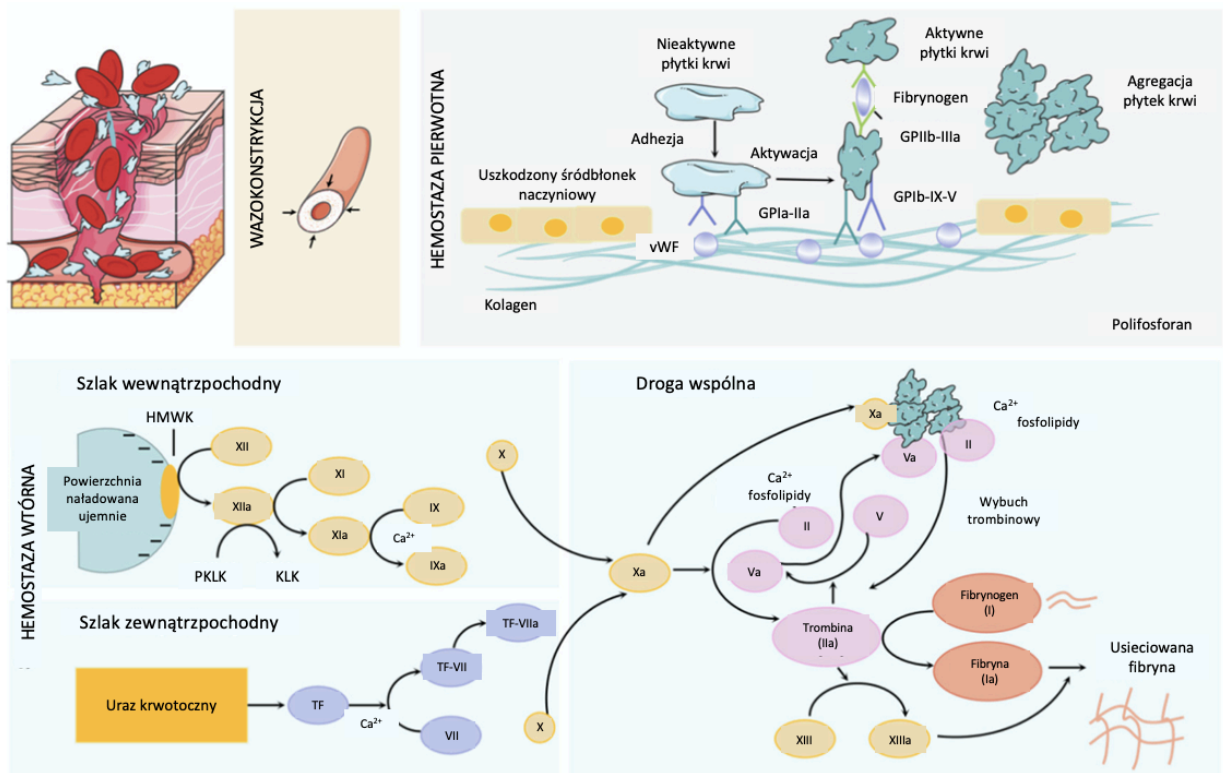
SZLAK ZEWNĄTRZPOCHODNY

Szlak wewnątrzpochodny rozpoczyna się, gdy czynnik tkankowy wiąże się z czynnikiem VII i aktywuje go. Aktywowany czynnik VII (czynnik VIIa) dodatkowo aktywuje czynnik X i czynnik IX poprzez proteolizę. Aktywowany czynnik IX (czynnik IXa) wiąże się ze swoim kofaktorem – aktywowanym czynnikiem VIII (czynnikiem VIIIa), co prowadzi do aktywacji czynnika X (czynnika Xa). Szlak zewnętrzny mierzy się klinicznie jako czas protrombinowy (PT, ang. prothrombin time) [143,144].

DROGA WSPÓLNA

Droga wspólna krzepnięcia rozpoczyna się w momencie aktywacji czynnika Xa przez kompleks tenazy. Tenaza ma dwie postacie: zewnętrzną, składającą się z czynnika VII, czynnika III (czynnika tkankowego) i Ca^{2+} lub wewnętrzną, składającą się z kofaktora, czynnika VIIIa, czynnika IXa, fosfolipidów i Ca^{2+} . Po aktywacji do czynnika Xa, przechodzi on do aktywacji czynnika II (protrombiny) do czynnika IIa (trombiny). Ponadto czynnik Xa wymaga fosfolipidów, Ca^{2+} oraz czynnika Va, jako kofaktora do rozszczepienia protrombiny na

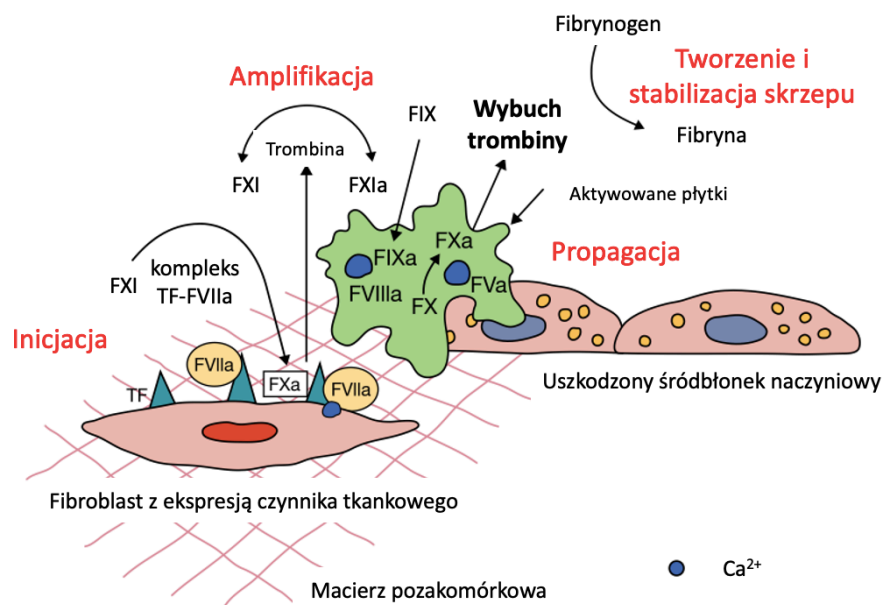
trombinę. Czynniki IIa (trombina) następnie aktywuje fibrynogen do fibryny. Trombina aktywuje także inne czynniki szlaku wewnętrznego (czynnik XI), a także kofaktory V i VIII oraz czynnik XIII. Końcowe etapy kaskady krzepnięcia obejmują konwersję fibrynogenu do monomerów fibryny, która polimeryzuje i tworzy siatkę polimeru fibryny, w wyniku czego powstaje usieciowany skrzep fibrynowy. Reakcja ta jest katalizowana przez aktywowany czynnik XIII (czynnik XIIIa), który stymuluje boczne łańcuchy lizyny i kwasu glutaminowego, powodując sieciowanie cząsteczek fibryny i tworzenie stabilizowanego skrzepu [143,144].



Rycina 16. Schemat procesu hemostazy (modyfikacja własna) [145].

KOMÓRKOWY MODEL KRZEPNIĘCIA

Wraz z ze wzrostem wiedzy naukowców na temat roli białek powierzchniowych np. płytek krwi w procesie krzepnięcia oraz obserwacje, które wykazały wzajemne oddziaływanie szlaków krzepnięcia, stało się jasne, że powyższy model nie odzwierciedla całkowicie fizjologii procesu hemostazy in vivo. Hoffmann i Monroe zaproponowali komórkowy model krzepnięcia, który opiera się na występowaniu czterech odrębnych faz: inicjacji, amplifikacji, propagacji i terminacji, a nie niezależnych ścieżek [137,142]. Graficzny schemat i przebieg procesu przedstawiono na rycinie 17 i w tabeli 8.



Rycina 17. Schemat komórkowego modelu krzepnięcia (modyfikacja własna) [146].

Tabela 8. Przebieg procesu krzepnięcia według komórkowego modelu [146].

| Faza procesu krzepnięcia | Zaangażowane komórki/białka | Mediatory i przebieg |
|--------------------------|---|---|
| Inicjacja | Fibroblasty z ekspresją czynnika tkankowego | Wytwarzanie niewielkiej ilości czynników IXa, Xa i trombiny przez kompleks TF-FVIIa. |
| Amplifikacja | Płytki krwi w spoczynku | Aktywacja płytek krwi (w tym aktywacja GP IIb/IIIa), uwalnianie czynnika von Willebranda z komórek śródbłonka i aktywacja czynników V, VIII, XI na powierzchni płytek krwi. |
| Propagacja | Aktywowane płytki krwi | Wytwarzanie czynnika Xa i kompleksu tenazy IXa-FVIIIa i protrombinazy (czynniki Xa-Va) na powierzchni płytek krwi w masowej generacji trombiny (przy udziale Ca ²⁺); łączenie aktywowanych płytek krwi przez fibrynogen poprzez aktywowane receptory GP IIb/IIIa. |
| Terminacja | TFPI, PC, PS i AT. | Gdy w miejscu uszkodzenia utworzy się skrzep fibrynowy, proces krzepnięcia musi ograniczać się do miejsca uszkodzenia, aby zapobiec całkowitemu zamknięciu naczynia. Do kontrolowania rozprzestrzeniania się aktywacji krzepnięcia zaangażowane antykoagulanty. |

TFPI - Inhibitor szlaku czynników tkankowych (ang.), PC – białko C (ang. protein C), PS- białko S (ang. protein S), AT- antytrombina (ang. antithrombin).

4.3. Czynn timer von Willebranda

4.3.1. Biosynteza i fizjologiczna rola czynn timer von Willebranda

Czynnik von Willebranda jest to adhezyjna glikoproteina, która została odkryta w 1924 roku przez fińskiego lekarza Erika von Willebranda [147]. Czynn timer von Willebranda składa się z szeregu dimerów dojrzałych podjednostek konstytutywnych, o masie cząsteczkowej w zakresie od 500 do 20 000 kDa i jest kodowany przez gen zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 12 (12p13.2), obejmujący około 178 kb i 52 eksony. Produktem genu jest białko o długości 2813 aminokwasów. Biosynteza vWF in vivo ogranicza się do komórek śródbłnka naczyniowego i megakariocytów. Komórki śródbłnka naczyniowego syntetyzują vWF jako pre-pro-vWF, peptyd sygnałowy, propeptyd i dojrzałą podjednostkę vWF [148]. Cząsteczka vWF jest przechowywana w ziarnistościach α lub specyficznych organellach zwanych ciałami Weibela-Palade'a. Podstawową rolą czynn timer jest promowanie adhezji podśródbłkowej płytek krwi, interakcji i agregacji płytek krwi, co sprzyja dalszemu krzepnięciu krwi. Ponadto, vWF pełni rolę białka nośnikowego czynn timer VIII krzepnięcia, chroniąc go przed degradacją proteolityczną, przedłużając jego okres półtrwania w osoczu i zapewniając transport do miejsca uszkodzenia [147].

4.3.2. Znaczenie czynn timer von Willebranda w chorobach nowotworowych

Uważa się, że czynnik von Willebranda jest swoistym mostem łączącym proces hemostazy i komórki nowotworowe. Szczególne znaczenie ma fakt, że vWF odgrywa ważną rolę w patogenezie zakrzepicy [149]. Ponadto, u pacjentów chorych na nowotwory obserwuje się podwyższony poziom vWF, który koreluje z zaawansowaniem choroby. Podwyższony poziom czynn timer von Willebranda u pacjentów przyczynia się nie tylko do koagulopatii związanych z nowotworem, ale może także pośredniczyć w progresji nowotworów i tworzeniu przerzutów [150]. Jest to spowodowane uwalnianiem przez komórki nowotworowe vWF z komórek śródbłnka naczyniowego, jednak mechanizm tego zjawiska nie jest do końca oczywisty [149]. Uważa się, że niektóre nowotwory są zdolne do kierowania aktywacją śródbłnka naczyniowego i wydzielaniem vWF. Odbywa się to za pośrednictwem wydzielania przez komórki nowotworowe np. cytokin zapalnych, metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej i mediatorów proangiogennych. Ponadto istnieją dowody wskazujące na to, że vWF może być wydzielany nie tylko z komórek śródbłnka naczyniowego otaczających

nowotwór, ale też z samego mikrośrodowiska guza. Badania wykazały, że linie nowotworowe niemające pochodzenia śródbłonkowego również wydzielają vWF. Do takich nowotworów należą: kostniakomięsak, rak jelita grubego, glejaki, rak żołądka i rak wątrobowokomórkowy [151]. Jedno jest pewne, wydzielanie vWF przyczynia się do adhezji i przezśródbłonkowej migracji komórek nowotworowych, co jest kluczowe dla rozsiewu nowotworu. Badania wykazały, że vWF może regulować angiogenezę, promować sygnalizację prozapalną i przepuszczalność naczyń, co może prowadzić do wzrostu komórek nowotworowych i ich wynaczynienia przez ścianę naczyń [150]. Ponadto, uważa się, że vWF można uznać za dokładny i swoisty biomarker wznowy raka piersi [133].

4.4. Fibrynliza

Fibrynliza to proces proteolitycznej degradacji sieci fibrynowej, w wyniku której dochodzi do przywrócenia drożności łożyska naczyniowego [152]. Fibryna jest substratem fibrynlizy, będąc zarówno powierzchnią wiązania i rozwoju kluczowych reakcji, jak i substancją, na którą oddziałuje enzym – plazmina. Te dwie cechy można definiować jako dwa kluczowe etapy fibrynlizy tj. wytwarzanie plazminy oraz trawienie fibryny. Średnica włókien fibryny i architektura skrzepu wpływają na proces fibrynlizy, dlatego stabilność i oporność skrzepu są w znacznym stopniu determinowane na etapie tworzenia skrzepu [153]. Fibrynliza jest regulowana głównie przez aktywatory plazminogenu typu tkankowego (t-PA, ang. tissue plasminogen activator) i typu urokinazy (u-PA, ang. urokinase plasminogen activator), które przekształcają plazminogen w plazminę w celu zainicjowania lizy włókien fibrynowych oraz inhibitory lityczne, które utrudniają rozpuszczanie złągów fibryny tj. inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1, alfa 2-antyplazminę i aktywowany trombiną inhibitor fibrynlizy (TAFI, ang. thrombin activatable fibrinolysis inhibitor). Ponadto, oprócz pierwotnie rozpoznanej funkcji trombolitycznej, stwierdzono również, że układ fibrynolityczny odgrywa kluczową rolę w np. przebudowie tkanek, odpowiedzi immunologicznej oraz w rozwoju i progresji nowotworów [152].

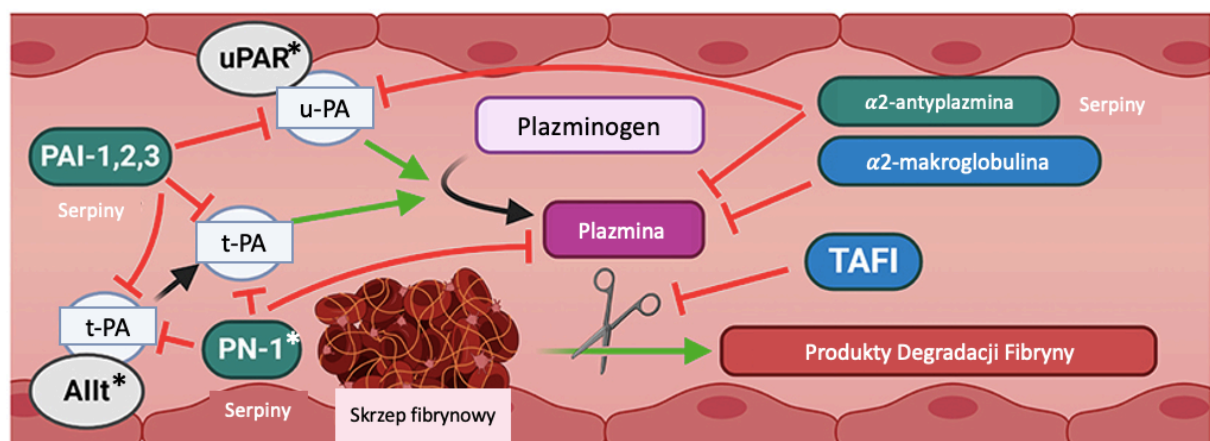
t-PA

Tkankowy aktywator plazminogenu to główna proteaza serynowa zawierająca N-końcową domenę fibronektyny typu II, domenę czynnika wzrostu, dwie domeny kringle

i C-końcową domenę katalityczną. Jest to główny aktywator plazminogenu we krwi. Tkankowy aktywator plazminogenu jest syntetyzowany i przechowywany w komórkach śródbłonna naczyniowego jako jednołańcuchowy zymogen. ECs uwalniają t-PA do krwi po stymulacji między innymi przez trombinę, histaminę, bradykininę [154]. t-PA ma działanie trombolityczne tj. degradację złożeń fibryny. Rozszczepia plazminogen, tworząc aktywną formę enzymatyczną plazminę, która rozrywa wiązania poprzeczne pomiędzy cząsteczkami fibryny, stanowiące strukturalną podporę skrzepu krwi. W wyniku tego dochodzi do rozkładu skrzepu z wytworzeniem produktów degradacji fibryny [155].

PAI-1

Inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 reguluje t-PA i u-PA oraz jest głównym inhibitorem układu fibrynolitycznego. PAI-1 jest wytwarzany w komórkach śródbłonna naczyniowego i przechowywany w płytkach krwi. Po aktywacji płytki krwi uwalniają PAI-1, aby stłumić fibrynozę i w ten sposób promować stabilizowanie skrzepu. PAI-1 krąży w dwóch postaciach: aktywnej i utajonej. Aktywny PAI-1 jest niestabilny in vitro i w ciągu kilku godzin nieodwracalnie przekształca się w postać utajoną [154].



Rycina 18. Sygnalizacja szlaku fibrynozy (modyfikacja własna) [156].

* **Wyjaśnienie skrótów z Ryciny 18:**

Allt – tetramer aneksyny II (ang. annexin II tetramer), PN-1 – proteazowa neksyna 1 (ang. protease Nexin-1), u-PAR - receptor powierzchniowy aktywatora plazminogenu urokinazy (ang. urokinase-type plasminogen activator receptor).

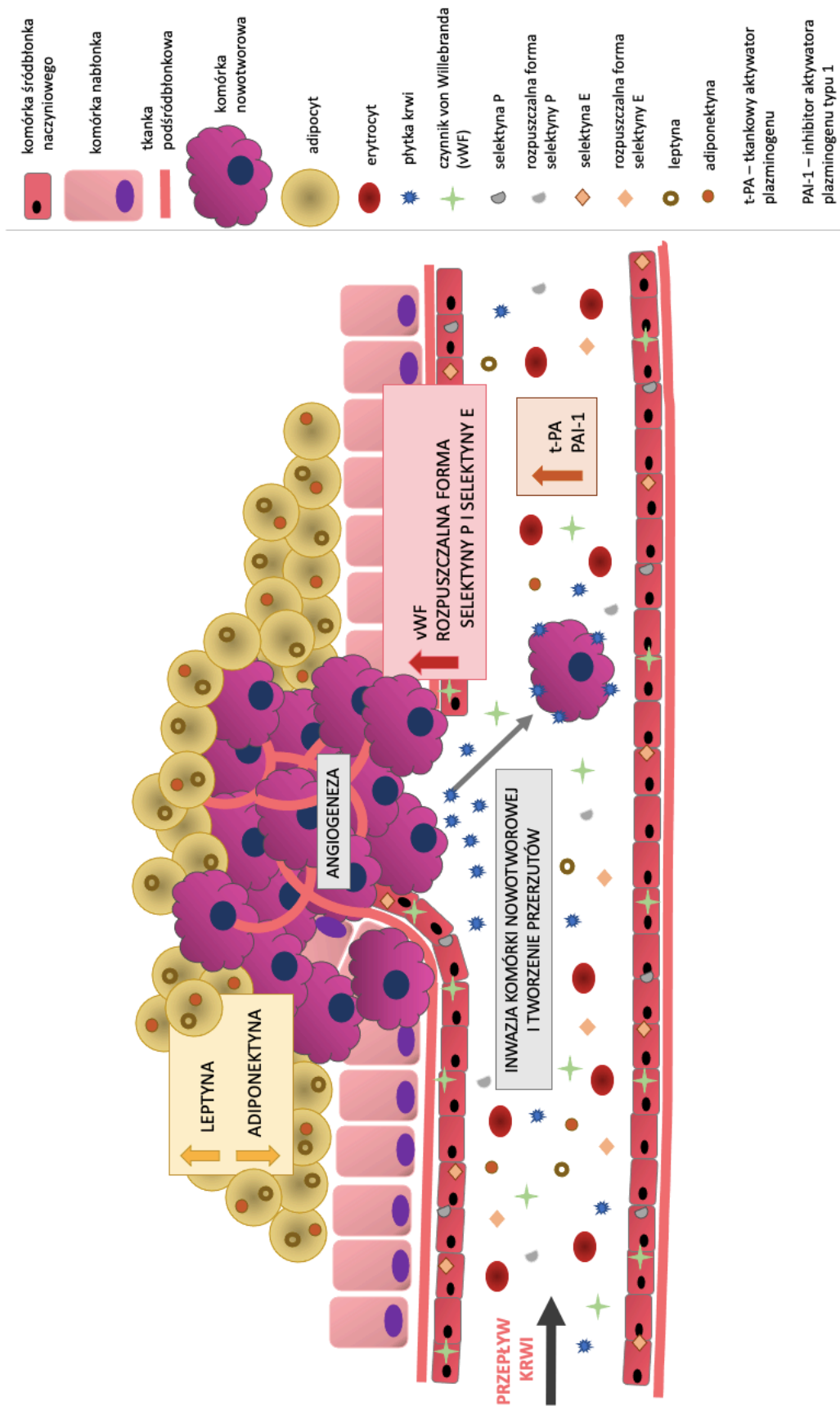
4.4.1 Tkankowy aktywator plazminogenu a proces nowotworowy

Wpływ t-PA na proces nowotworowy nie jest do końca jasny. Uważa się, że przyczynia się do procesów związanych z transformacją nowotworową tj. proliferacji, migracji, inwazji i rozwoju przerzutów [157]. Tkankowy aktywator plazminogenu wywołuje proteolityczną degradację błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej, przez co doprowadza do migracji komórek nowotworowych po całym organizmie i tworzeniu przerzutów. Ponadto, t-PA indukuje proliferację komórek raka piersi [158]. Uważa się, że antygen t-PA może służyć jako niezależny biomarker ryzyka nawrotu lub rozsiewu choroby we wczesnym stadium raka piersi [157]. T-PA występuje na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego, co wskazuje, że może brać udział w neoangiogenezie. T-PA wykazuje zdolność do bezpośredniej indukcji ekspresji VEGF - głównego czynnika proangiogenego poprzez transaktywację p38 przez układ ERK [159].

4.4.2. Inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 a nowotworzenie

PAI-1, pomimo swojej funkcji jako inhibitora urokinazy i tkankowego aktywatora plazminogenu odgrywa paradoksalną rolę pronowotworową, promując angiogenezę i przeżycie komórek nowotworowych [160]. Uważa się, że PAI-1 jest jednym z najbardziej wiarygodnych biomarkerów i prognostyków w wielu typach nowotworów. Niektóre badania wykazują, że PAI-1 ma działanie stymulujące wzrost, prowadzące do przejścia cyklu komórkowego z fazy G1 do fazy S. Jako serpina PAI-1 hamuje wewnątrzkomórkową kaspazę 3, chroniąc komórki nowotworowe przed apoptozą indukowaną chemioterapią. Badania wykazują, że PAI-1 jest stymulatorem angiogenezy poprzez promowanie migracji, przeżycia i proliferacji w komórkach śródbłonna naczyniowego. Wynika to z jej funkcji hamowania proteaz i wiązania witronektyny [161]. Podwyższone stężenie PAI-1 u chorych na raka piersi koreluje z agresywnością nowotworu, jego zdolnością do tworzenia przerzutów i słabą odpowiedzią na leczenie [162].

5. Graficzne podsumowanie wstępu



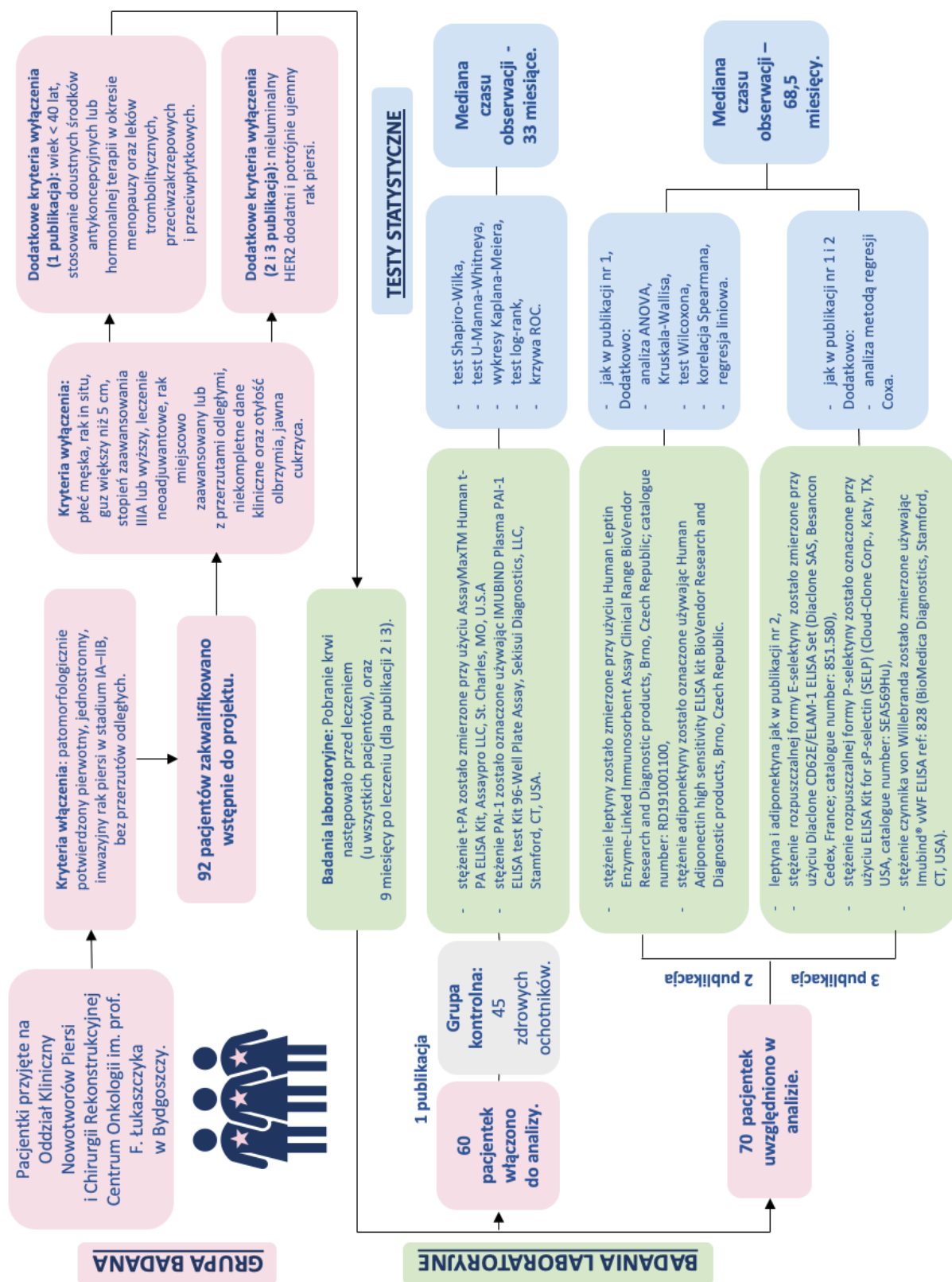
Rycina 19. Podsumowanie graficzne wstępu teoretycznego.

II. CEL

Rak piersi należy do najpoważniejszych problemów onkologicznych i stanowi coraz większe wyzwanie społeczne, ekonomiczne oraz zdrowotne na świecie. W 2020 roku inwazyjny rak piersi był najczęściej diagnozowanym nowotworem u kobiet [8]. Nieustannie poszukuje się markerów, które mogą mieć realny wpływ na rozwój oraz przeżycie pacjentek z tym nowotworem. Ostatnio, liczne badania wskazują, że tkanka tłuszczowa oraz komórki śródbłonna naczyniowego prezentują nie w pełni poznany mechanizm onkogenny. Ich zaburzenia prowadzą do wielu konsekwencji np. zwiększenia agresywności komórek nowotworowych i powstawaniu przerzutów.

Celem pracy była ocena stężeń markerów produkowanych przez komórki śródbłonna naczyniowego (tj. t-PA, PAI-1, sP-selektyny, sE-selektyny i vWF) oraz tkankę tłuszczową (leptyna, adiponektyna) w grupie pacjentek z pierwotnym, jednostronnym rakiem piersi bez przerzutów odległych. Parametry układu fibrylizy porównano przed leczeniem u pacjentek chorych oraz u zdrowych ochotników. Pozostałe markery produkowane przez śródbłonek naczyniowy oraz tkankę tłuszczową oceniano przed i po zastosowanym leczeniu. Ponadto, podjęto próby określenia zależności pomiędzy wszystkimi markerami a wskaźnikami kliniko-patologicznymi. Kolejnym celem badań było określenie związków między tymi parametrami a rodzajem zastosowanego leczenia w przypadku markerów porównywanych przed i po leczeniu. Ponadto, celem pracy była również ocena przydatności tych parametrów w przewidywaniu występowania choroby i jej nawrotów w czasie około 3 letniej obserwacji (parametry fibrylizy) oraz ocena wartości prognostycznej na podstawie 6 letniej obserwacji (selektyna P, selektyna E, vWF, leptyna, adiponektyna i LAR).

III. MATERIAŁY I METODY



Rycina 20. Schemat blokowy metodyki badań prowadzących do powstania cyklu publikacji.

IV. CYKL PUBLIKACJI

Podstawą do wnioskowania o uzyskanie tytułu doktora nauk medycznych, jest osiągnięcie naukowe składające się z 3 artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach znajdujących w ministerialnym wykazie czasopism naukowych w latach 2020 - 2023. Stanowią one spójnie tematyczny zbiór publikacji pod tytułem: „**Ocena przydatności oznaczenia wybranych markerów wydzielanych przez komórki śródbłonna naczyniowego oraz tkankę tłuszczową jako czynników prognostycznych w grupie pacjentek z pierwotnym rakiem piersi.**” Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (Impact Factor) wynosi **10,475** oraz **240 punktów** Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW). W pierwszej publikacji byłam drugim autorem, zaś w pozostałych dwóch publikacjach byłam pierwszym autorem. Publikacje zostały przedstawione w kolejności chronologicznej:

1. Ruszkowska-Ciastek B, **Kwiatkowska K**, Bielawska S, Robakowska M, Bielawski K, Rhone P. Evaluation of the prognostic value of fibrinolytic elements in invasive breast carcinoma patients. *Neoplasma*. 2020;67(5):1146-1156. (praca oryginalna)

Impact Factor: **2,575**

Punktacja MNiSW: **70.000**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: analizie statystycznej, przeglądzie piśmiennictwa, redagowaniu manuskryptu, interpretacji wyników i sformułowaniu wniosków badawczych.

Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 40 %.

2. **Kwiatkowska K**, Rhone P, Wrzeszcz K, Ruszkowska-Ciastek B. High post-treatment leptin concentration as a prognostic biomarker of the high risk of luminal breast cancer relapse: A six-year comprehensive study. *Life (Basel)*. 2022;12(12):2063. (praca oryginalna)

Impact Factor: **3,20**

Punktacja MNiSW: **70.000**

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

Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 75 %.

3. **Kwiatkowska K**, Rhone P, Koziorzemska P, Formanowicz D, Ruszkowska-Ciastek B. Complex analysis of endothelial markers as potential prognostic indicators in luminal invasive breast carcinoma patients: Outcomes of a six-year observational study. *Biomedicines*. 2023;11(8):2246. (praca oryginalna)

Impact Factor: **4,70**

Punktacja MNiSW: **100.000**

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

Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 75 %.

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:

Ruszkowska-Ciastek B, Kwiatkowska K, Bielawska S, Robakowska M, Bielawski K, Rhone P. Evaluation of the prognostic value of fibrinolytic elements in invasive breast carcinoma patients. *Neoplasma*. 2020;67(5):1146-1156. IF: 2,575; punktacja MNiSW: 70.000

Związek między rakiem piersi a zaburzeniami hemostazy został dostrzeżony już w XIX wieku przez Armanda Trousseau, od którego nazwiska nazwano zdarzenia zakrzepowozatorowe rozwijające się u pacjentów chorych na nowotwory (zespół Trousseau). Uważa się, że u 15 % osób chorych na nowotwory dochodzi w trakcie trwania choroby do incydentów zakrzepowo-zatorowych, a nawet u 50% pacjentów pośmiertnie stwierdza się żylną chorobę zakrzepowo-zatorową (VTE, ang. venous thromboembolism). Patofizjologia VTE związanej z nowotworem, nie jest do końca wyjaśniona, wyróżnia się 3 grupy czynników prawdopodobieństwa rozwoju VTE: **zależne od pacjenta** (wiek, ograniczenie mobilności, otyłość, infekcje, leukocytoza, nadpłytkowość oraz wcześniejsze przebycie VTE), **zależne od leczenia** (chemioterapeutyki, uzupełniająca terapia hormonalna, cewniki dożylne i zabiegi chirurgiczne) oraz **związane z charakterystyką nowotworu** (pierwotne umiejscowienie i zaawansowanie nowotworu, aktywację płytek krwi, czynniki proangiogenne, nadekspresję TF oraz PAI-1).

Nieprawidłowości w układzie fibrynolitycznym u chorych na nowotwory mogą wpływać na zwiększenie ruchliwości komórek nowotworowych, co sprzyja rozwojowi przerzutów i progresji choroby. Główne elementy fibrynolizy to tkankowy aktywator plazminogenu i inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1. T-PA inicjuje transformację plazminogenu do plazminy, degradowuje błonę podstawną i macierz zewnątrzkomórkową, może brać udział w neoangiogenezie. T-PA wykazuje zdolność do bezpośredniej indukcji ekspresji VEGF. Natomiast PAI-1 jest głównym inhibitorem t-PA oraz urokinazy, regulującym adhezję i migrację komórkową. PAI-1 wywiera działanie parakrynnie i autokrynnie na komórki oraz zmniejsza apoptozę komórek nowotworowych, wspomaga angiogenezę chroniąc macierz pozakomórkową przed nadmierną degradacją (hamowanie proteolizy). Podwyższone stężenie PAI-1 u chorych na raka piersi koreluje z agresywnością nowotworu, jego zdolnością do tworzenia przerzutów i słabą odpowiedzią na leczenie.

W publikacji nr 1 badaniem objęto 60 kobiet w wieku 41-67 lat (średnia 52,9 lat) z pierwotnym, jednostronnym rakiem piersi bez przerzutów odległych (M0). Szczegółowe informacje odnośnie charakterystyki grupy badanej i kontrolnej zostały zawarte na rycinie 20. Głównymi kryteriami włączenia pacjentek z nowotworem piersi były: pierwotny, inwazyjny, jednostronny rak piersi we wczesnym stadium (IA–IIB), brak stosowanego leczenia neoadjuwantowego, brak zaawansowania miejscowego lub przerzutowego oraz dodatkowo stabilny stan kliniczny w okresie obserwacji. Głównymi kryteriami wyłączenia były: rak in situ, guz większy niż 5 cm, stopień zaawansowania IIIA lub wyższy, zastosowane wcześniej leczenie neoadjuwantowe, rak miejscowo zaawansowany lub z przerzutami, potrójnie ujemny lub HER2-dodatni nowotwór piersi. W analizie przeżycia wolnego od nawrotów wystąpiło dziesięć zdarzeń, a okres obserwacji trwał od 28 do 40 miesięcy (mediana czasu obserwacji wyniosła 33 miesiące), a odsetek nawrotów wyniósł 16,7%. Do badania włączono także 45 zdrowych ochotników (przedział wiekowy 44–68 lat) poddanych rutynowym badaniom fizykalnym w okresie styczeń–czerwiec 2015 r. U tych osób wykluczono raka piersi, wykonując kontrolną mammografię.

Celem pracy była ocena stężeń tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) oraz ich stosunków: t-PA/PAI-1 i PAI-1/t-PA u chorych na raka piersi i u osób zdrowych oraz znalezienie zależności analizowanych parametrów z czynnikami kliniczno-patologicznymi u pacjentek z rakiem piersi. Dodatkowym celem była ocena przydatności parametrów fibrynolitycznych w przewidywaniu wystąpienia choroby nowotworowej i nawrotu choroby.

Wśród pacjentek z grupy badanej dominował typ luminalny A (37 pacjentek (62%)) oraz typ przewodowy (53 pacjentek (88%)) nowotworu piersi. Mediana wielkości guza wynosiła 16 mm (zakres 5–35 mm). U siedemnastu pacjentów (28%) stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych (N1). W grupie chorych na raka piersi 49 (82%) pacjentek przeszło operację oszczędzającą pierś (BCS), a 11 (18%) miało zmodyfikowaną radykalną mastektomię (MRM). Jeśli chodzi o stopień zaawansowania TNM, odnotowano 42 przypadki w stadium I (70%) i 18 w stadium II (30%). Spośród pacjentek chorych na raka piersi 59 (98,3%) przeżyło, a u dziewięciu chorych (15%) doszło do nawrotu choroby w wyniku przerzutów ogólnoustrojowych lub przerzutów do przeciwległych węzłów chłonnych pachowych. Ostatecznie wskaźnik przeżycia bez nawrotów choroby (RFS) wyniósł 83,3%.

W wyniku przeprowadzonych analiz statystycznych **w pierwszej publikacji** uzyskano istotnie wyższe stężenie PAI-1 w grupie chorych na raka piersi w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, u pacjentek z rakiem piersi do 55 roku życia odnotowano istotnie wyższe stężenie PAI-1 w porównaniu do dobranych wiekowo zdrowych kobiet. Następnie dokonano rozkładu profilu fibrynolitycznego według cech kliniczno-patologicznych w badanej grupie. Wyższy potencjał fibrynolityczny (t-PA/PAI-1) zaobserwowano w nowotworach T2 i IIA+IIB, natomiast wyższy profil antyfibrynolityczny (PAI-1/t-PA) stwierdzono w guzach T1 i IA+IB. Stwierdzono wyraźną tendencję do wyższego stężenia t-PA w guzach T2, stopniach IIA+IIB oraz u pacjentów z zajęтыми węzłami chłonnymi. Ponadto, zaobserwowano tendencję do wyższego stosunku t-PA/PAI-1 i niższego PAI-1/t-PA w przypadku pacjentów z potwierdzonym zajęciem węzłów chłonnych.

W następnym etapie analizy statystycznej skonstruowano krzywe ROC w celu określenia dokładności diagnostycznej elementów układu fibrynolizy: t-PA, PAI-1 oraz stosunków t-PA/PAI-1 i PAI-1/t-PA w przewidywaniu zachorowania na raka piersi. Uzyskano następujące punkty odcięcia: PAI-1 – 33,91 ng/ml, t-PA – 5,3 ng/ml, stosunek PAI-1/t-PA - 7,5. Analiza krzywych ROC wykazała, że jedynie dla PAI-1 osiągnięto przydatność diagnostyczną testu. Wyznaczono stężenie PAI-1 w osoczu wynoszące 33,91 ng/ml z czułością 90% i swoistością 36% jako najlepszą wartość odcięcia do rozróżnienia zdrowych osób od przypadków raka piersi. Następnie przeprowadzono dalszą analizę w celu przewidywania nawrotu choroby wśród pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi. Największą wartość AUC^{ROC} uzyskano dla stężenia t-PA. Punkt odcięcia dla stężenia t-PA ustalono na 5,3 ng/ml przy 66% swoistości i 70% czułości. Wartość ta pozwala na rozróżnienie pacjentów z nawrotem choroby i pacjentów bez nawrotu choroby .

Na podstawie krzywych przeżycia Kaplana-Meiera wykazano, że pacjenci z przedoperacyjnym stężeniem t-PA wyższym niż 5 ng/ml mają gorsze rokowanie w przyszłości. Nawrót choroby w grupie pacjentów z wyższym stężeniem t-PA wystąpił u 7 z 28 (25%). Natomiast w grupie z niższym wyjściowym stężeniem t-PA u 3 z 32 (9%) przypadków doszło do nawrotu choroby. Ponadto, wykazano, że niższy potencjał antyfibrynolityczny (stosunek PAI-1/t-PA) niż 7,5 wiąże się z krótszym przeżyciem. Nawrót choroby w grupie pacjentów z wyższym stosunkiem PAI-1/t-PA wystąpił u trzech z 33 (9%). Natomiast w grupie z niższym wyjściowym stosunkiem PAI-1/t-PA u 7 z 27 (26%) przypadków doszło do nawrotu choroby.

Z badania wynika, że stężenia t-PA i PAI-1 przed leczeniem mogą służyć zarówno jako markery predykcyjne, jak i prognostyczne we wczesnym stadium raka piersi. Stężenie PAI-1 w osoczu wynoszące 33,91 ng/ml z czułością 90% i swoistością 36% jest najlepszą wartością odcięcia do rozróżnienia zdrowych osób od przypadków raka piersi. Ponadto, stężenie t-PA wynoszące 5,3 ng/ml przy 66% swoistości i 70% czułości pozwala na rozróżnienie pacjentów z nawrotem choroby i pacjentów bez nawrotu choroby. Ponadto, pacjentki ze stężeniem t-PA wyższym niż 5 ng/ml wykazują gorsze rokowanie i w tej grupie doszło do większej ilości nawrotów choroby. Potencjał antyfibrynolityczny (wyrażony przez stosunek PAI-1/t-PA) niższy niż 7,5 wiąże się z gorszym rokowaniem i krótszym czasem wolnym od progresji choroby.

Evaluation of the prognostic value of fibrinolytic elements in invasive breast carcinoma patients

B. RUSZKOWSKA-CIASTEK^{1*}, K. KWIATKOWSKA¹, S. BIELAWSKA¹, M. ROBAKOWSKA¹, K. BIELAWSKI¹, P. RHONE²

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

*Correspondence: ruszkowska.basia@gmail.com

Received October 22, 2019 / Accepted January 22, 2020

Breast cancer (BrC) is one of the most serious oncological problems in the world. The aim of the study was to evaluate concentrations of tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and their ratios: t-PA/PAI-1 and PAI-1/t-PA in breast cancer patients and in healthy individuals and to estimate the ability of fibrinolytic parameters in predicting neoplasm disease and disease relapse. One hundred and five women were enrolled in the study, including 60 cases with primary BrC, (M0) and 45 healthy females. Follow-up was completed in all BrC patients with a 16.7% recurrence rate. An immunoassay of t-PA, PAI-1 in all cases was made as well as the immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors, human epidermal growth factor receptor 2, E-cadherin, and Ki-67 was performed in BrC subjects. A significantly higher PAI-1 concentration in breast cancer patients below the age of 55 than in controls was obtained. According to the ROC curve analysis, the PAI-1 concentration demonstrates the most accurate prognostic value with the cut-off point at 33.91 ng/ml, with 90% sensitivity and 36% specificity, which discriminates between controls and cancer patients. However, t-PA presents the highest area under the receiver-operating characteristic curves (AUC^{ROC})=0.634 in predicting disease relapse with the cut-off value of 5.3 ng/ml. According to the Kaplan-Meier curves, a high concentration of t-PA (>5 ng/ml) and a lower PAI-1/t-PA ratio (<7.5) are associated with shorter survival. Evaluation of plasma t-PA and PAI-1 concentrations may deliver relevant prognostic information for breast cancer patients.

Key words: invasive breast cancer, fibrinolytic system, thrombosis, metastasis

The neoplastic process is characterized by clonal, unrestrained cell proliferation. The balance between proliferation and apoptosis in cancer cells is disrupted. Most types of cancer cells proliferate as solid masses of tissue (solid tumors); one of its representatives is breast cancer (BrC) [1]. Breast cancer remains the most common neoplasm in women population with 2.0 million newly diagnosed cases in 2018 globally [2]. BrC was one of the first cancers investigated in antiquity. The first descriptions of nodular alterations come from ancient Egypt. The Edwin Smith Surgical Papyrus, dating back to 3000–2500 B.C., and presumably ascribable to Imhotep (the Egyptian physician, architect), delivers bona fide depiction of breast cancer [3, 4]. Breast cancer is strongly related to non-modifiable (age, genetic background, the occurrence of menarche and menopause, *in situ* breast carcinoma) and modifiable (application of oral contraceptives, menopausal hormonal therapy, parity status, lack of lactation, obesity, sedentary lifestyle) risk factors [1].

Histological classification divides breast cancer into two groups: non-invasive (*in situ* – limited to the epithelial layer of the mammary gland) and invasive (tumor cells infiltrate through the duct wall into stroma). Both carcinomas were categorized as ductal and lobular on grounds of the niche from which the tumor originated. In the invasive carcinoma group, 75% make up an invasive ductal carcinoma (IDC) no special type (NST), which displays a wide spectrum of morphological variations. Thus, it demonstrates a diverse aggressive nature or different response to therapy [5]. Subsequently, the immunohistochemical (IHC) analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2), Ki-67 (mitotic index), and E-cadherin were introduced to the clinical practice in order to stratified patients with BrC according to molecular subtypes as well as to assess future outcomes and to establish personalized therapy. In the last twenty years, there has been a prominent breakthrough in the diagnosis of breast

cancer including molecular methods such as a genomic hybridization or Sanger sequencing and NGS (Next-Generation Sequencing). The information obtained thanks to them is used to improve the classification of breast cancer and develop narrow tumor subdivisions in order to offer patients an adequate therapy scheme [6].

In the 19th century, Armand Trousseau noticed the link between cancer and hemostasis disorders. Thromboembolic events developing in patients with cancer are named as the Trousseau syndrome. It has been shown that in about 15% of patients with cancer, thromboembolic events occur during the clinical course of the disease, while in 50% of patients, evidence of venous thromboembolism (VTE) is confirmed during post-mortem examinations. The pathophysiology of cancer-related VTE is not completely elucidated. There are 3 classes of probability factors for VTE development: patient-, treatment- and cancer-associated. Patient-dependent factors include age, obesity, immobilization, infection, high white blood cells and platelets counts, previous incidents of VTE. Treatment-related such as chemotherapeutics, adjuvant hormonal therapy, intravenous catheters, and surgical procedures, and cancer-associated factors are primary site and advancement of the tumor, activation of platelets, pro-angiogenic agents, overexpression of tissue factor (TF), and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) [7, 8].

Interestingly, abnormalities in the fibrinolytic system in cancer patients may influence an increase of cell detachment that favors metastasis of tumor cells and the progression of the disease [9]. Fibrinolysis is controlled by a series of cofactors, inhibitors, and receptors. The main elements constitute the tissue-type plasminogen activator (t-PA) and the plasminogen activator inhibitor type 1. t-PA is a serine protease, which initiates a transformation of plasminogen to plasmin. Additionally, it causes degradation of the basement membrane and extracellular matrix. These, in turn, cause the spreading of cancer cells throughout the entire body. t-PA is present on endothelial cells surface, indicating that it may participate in neoangiogenesis [10, 11]. t-PA presents the ability to directly induce the vascular endothelial growth factor (VEGF – the main pro-angiogenic agent) expression via transactivation of p38 by the ERK system [12]. However, the importance of t-PA in the neoplastic process has not yet been fully clarified, and the study results are still divergent [11, 13, 14]. Whereas PAI-1 is a main inhibitor of t-PA and/or urokinase, and it regulates adhesion and cellular migration (connected with vitronectin) [9, 15]. PAI-1 exerts paracrine and autocrine effects on cells including depletion of cancer cells apoptosis [15, 16], promotes angiogenesis by protecting the extracellular matrix against excessive degradation through suppression of proteolysis [15]. Elevated PAI-1 levels in patients with breast cancer are correlated with tumor aggressiveness, its ability to metastasize, and poor treatment response [9, 16]. Thus, the aim of the study was to evaluate concentrations of tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), and their

ratios: t-PA/PAI-1 ratio and PAI-1/t-PA in breast cancer patients and in healthy individuals, and to find associations of analyzed determinants with clinicopathological factors in BrC cases. An additional purpose was to assess the ability of fibrinolytic parameters in predicting of neoplasm disease and disease relapse.

Patients and methods

Patient samples and clinical data. In this a single-center, prospective study 105 Caucasian ethnicity women were enrolled. Sixty females with newly diagnosed, invasive, unilateral breast cancer without distant metastases (M0) were recruited from the Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre in Bydgoszcz, Poland. The mean age of BrC cases was 52.9 years (range 41–67 years). The patients underwent a complete clinicopathological and post-surgical examination and were well-recognized with respect to the invasion standards. Invasive or infiltrative carcinomas were defined as malignant abnormal proliferation of neoplastic cells in the breast tissue, which has penetrated through the duct wall into the stroma. In order to classify the histological type of breast cancer, we used the classification of the World Health Organization. The median tumor size was 16 mm (range 5–35 mm). Seventeen subjects (28%) demonstrated lymph node metastasis (N1). Tumor stage was determined in all cases according to the AJCC 7th Edition Staging for Breast Cancer 2010 [17]. The tumor localization, diameter, histological, molecular, and clinical types as well as histological grade according to Elston-Ellis classification of BrC patients are presented in Table 1. There was no perioperative mortality and the average length of hospital stay was 7.0 ± 1.1 days.

A total of 45 healthy volunteers (age range, 44–68 years) undergoing routine physical examination in January–June 2015 were also included. In those individuals, breast cancer was excluded by performing control mammography. All subjects were divided into two groups based on age: below 55 years and above 55 years. Menopausal status was determined with respect to natural menopause, which was defined as the permanent cessation of menstruation for at least 12 months. Parity was specified as the number of full-term pregnancies. Body mass index (BMI – kg/m^2) was categorized as normal (18.5–24.9), overweight (>25.0–29.9) according to WHO recommendations. Controls and breast cancer cases were age-, menopausal status-, BMI-, parity- matched (Table 2).

Inclusion and exclusion criteria for analyzed subjects. The major inclusion criteria for BrC patients were primary, invasive, unilateral, early-stage (IA–IIB) breast cancer, lack of application of neoadjuvant treatment, and absence of local or metastatic advancement, additionally stable clinical condition during the observational period. The exclusion criteria for all cases were as follows: age <40 years, male gender, uncompleted clinical information, uncontrolled cardiovascular disease, and visceral obesity, overt diabetes, using oral

Table 1. Clinical characteristics of the study group.

| Feature | Number of patients (%) |
|---|------------------------|
| Localization of the tumor | |
| Right breast | 30 (50%) |
| Left breast | 30 (50%) |
| Diameter of the tumor | |
| <20 mm | 42 (70%) |
| ≥20 mm <50 mm | 18 (30%) |
| Lymph node status | |
| Negative (N0) | 43 (72%) |
| Positive (N1) | 17 (28%) |
| Histological type | |
| Invasive ductal carcinoma (IDC) | 53 (88%) |
| Invasive lobular carcinoma (ILC) | 7 (12%) |
| TNM staging classification | |
| IA | 29 (48%) |
| IB | 13 (22%) |
| IIA | 14 (23%) |
| IIB | 4 (7%) |
| Grade according to Elston-Ellis | |
| 1 | 1 (1%) |
| 2 | 49 (82%) |
| 3 | 10 (17%) |
| Molecular type | |
| Luminal A (HR+/HER2-/Ki-67 <14%) | 37 (62%) |
| Luminal B (HR+/HER2-/Ki-67 ≥14%) | 12 (20%) |
| Luminal B HER2 (positive) (HR+/HER2+) | 3 (5%) |
| Non-luminal HER2 (positive) (HR-/HER2+) | 2 (3%) |
| Triple-negative (HR-/HER2-) | 6 (10%) |
| Estrogen receptor (ER) | |
| Negative | 8 (13%) |
| Positive | 52 (87%) |
| Progesterone receptor (PR) | |
| Negative | 10 (17%) |
| Positive | 50 (83%) |
| HER2 | |
| Negative | 55 (92%) |
| Positive | 5 (8%) |
| E-cadherin | |
| Negative | 4 (7%) |
| Positive | 56 (93%) |
| Ki-67 (%) | |
| <14 | 37 (62%) |
| ≥15 | 23 (38%) |

TNM classification of malignant tumors: T – tumor; N – node; M – metastasis; HR – hormonal receptors; HER-2 – human epidermal growth factor receptor 2; Ki-67 – proliferation marker

contraceptives or menopausal hormonal therapy as well as thrombolytic, anticoagulant, and antiplatelet agents.

Ethical approval. The study was performed under the appropriate Institutional ethics approvals (permission number: KB 547/2015) and in accordance with the principles embodied in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each participant.

Table 2. Baseline characteristics of the study group and controls.

| Feature | Number of patients (%) | Number of controls (%) |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| Age | | |
| <55 years | 35 (58%) | 27 (60%) |
| ≥55 years | 25 (42%) | 18 (40%) |
| BMI (kg/m²) | | |
| Normal (18.5 ≤ 24.99) | 37 (62%) | 27 (60%) |
| Overweight (25 ≤ 29.9) | 23 (38%) | 18 (40%) |
| Menopausal status | | |
| Premenopausal | 25 (42%) | 21 (47%) |
| Postmenopausal | 35 (58%) | 24 (53%) |
| Parity status | | |
| 0 | 7 (12%) | 3 (7%) |
| 1–2 | 44 (73%) | 35 (78%) |
| 3 and more | 9 (15%) | 7 (16%) |

Patient follow-up information. Follow-up was completed in all 60 BrC patients. For the relapse-free survival analysis, ten events occurred and follow-up ranged from 28 to 40 months (median follow-up was 33 months) with a 16.7% 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 as of the end of March 2019, and was expressed in months.

Blood sampling and laboratory tests. Venous blood samples from patients were drawn prior to any treatment, processed, and immediately analyzed for routine procedures. Blood samples were collected into cooled tubes (Becton Dickinson Vacutainer® System, Plymouth, UK) containing 0.13 mol/l trisodium citrate (final blood anticoagulant ratio 9:1). Samples were then mixed and centrifuged at 3000×g at 4 °C for 15 min, aliquoted and stored at –80 °C (as specified by the manufacturer) until assayed but no longer than six months. Storage conditions were carefully maintained, and aliquots were limited to one freeze-thaw cycle at the time of batch analysis.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). t-PA levels were measured in citrated plasma samples by commercial enzyme-linked immunosorbent assay (AssayMax™ Human t-PA ELISA Kit, Assaypro LLC, St. Charles, MO, U.S.A.). The cut-off level was set at 5.1 ng/ml on the basis of the 95th percentile noted in control women. PAI-1 levels were determined on citrated plasma samples using a commercially available enzyme immunoassay (IMUBIND Plasma PAI-1 ELISA test Kit 96-Well Plate Assay, Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, CT, USA) test. The reaction mixture was added to a 96-well plate. The cut-off level was set at 30 ng/ml on the basis of the 95th percentile observed in control women. All assays were run according to the manufacturer's specifications by personnel with no access to the clinical data of the patients.

Immunohistochemical detection of hormone receptors, Ki-67, and HER2. Determination of hormone

receptors including ER, PR as well as HER-2, Ki-67, and E-cadherin were assessed by immunohistochemistry according to a standard procedure, which had previously been published [18].

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the Statistical 13 program. The Shapiro-Wilk test was used to check compliance with the normal distribution. The Mann-Whitney U-test was used to analyze the difference in the expression of two independent variables. Data are expressed as median (Me) and the inter-quartile range (IQR) [lower quartile (Q1)/ upper quartile (Q3)]. Kaplan-Meier curves were used to express survival times, and the log-rank test was used to compare survival times. The progression-free survival (PFS) time was calculated from the date of enrolment until the relapse or progression of the disease. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to assess possible cut-off values. The area under the curve (AUC) was calculated in order to estimate diagnostic accuracy. The optimal cut-off points have been determined using the Youden index. A probability (p) <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Clinical summarization of the study population. The study included 105 Slavic descent females. Sixty of them suffered from invasive breast cancer and 45 women were free of breast cancer (control group), ranging in age from 41 to 68 (mean age of BrC subjects was 52.9 years; mean age of healthy individuals was 53.5 years). The BMI for BrC cases was 24.4 kg/m² and for controls was 24.7 kg/m². There were no significant differences between BrC patients and controls with respect to age, weight, BMI, parity, or menopausal status (all p>0.05). In breast cancer group 49 (82%) patients underwent breast-conserving surgery (BCS) and 11 (18%) had a modified radical mastectomy (MRM). In the histological differentiation of BrC, patients had differentiated invasive breast cancer in 50 cases (83%) including those with well- and moderate-differentiated breast carcinomas. There were also 10 patients with poorly differentiated cancers (17%). In terms of the tumor diameter, there were 42 T1 cases (70%) and 18 T2 cases (30%). In terms of the N stage, there were 43 N0 cases (72%) and 17 N1 subjects (28%). With respect to the TNM staging system, there were 42 stage I cases (70%) and 18 stage II cases (30%). The mean diameter of the tumor was 16 mm. Of the patients suffering from breast cancer, 59 (98.3%) survived, and nine patients (15.0%) developed disease recurrence due to systemic metastatic disease or metastasis to opposite axillary lymph nodes. Finally, the relapse-free survival (RFS) rate was 83.3%.

General comparison of the fibrinolytic profile in the study group and controls. In our study, we assessed the fibrinolytic and anti-fibrinolytic profiles by a division of the concentration of t-PA (the main fibrinolytic activator) by

PAI-1 level (the most powerful inhibitor of t-PA activity) and in an opposite manner. t-PA/PAI-1 ratio expresses the fibrinolytic profile but the PAI-1/t-PA ratio demonstrates the anti-fibrinolytic potential. At the beginning of the statistical analysis, the examined parameters were compared between groups. A significantly higher PAI-1 concentration in the breast cancer group compared to the controls was obtained (p=0.0494; Table 3).

Fibrinolytic profile according to age and body mass index in the study group and controls. Apart from a general comparative analysis of the study and control groups, we have made statistical calculations in all females based on age and BMI criteria (Tables 4 and 5). In BrC patients below the age of 55, a significantly higher PAI-1 concentration was reported (p=0.0125) in relation to the age-matched healthy women. However, we did not observe any dependencies with respect to BMI.

Distribution of the fibrinolytic profile according to clinicopathological attributes in the study group. We hypothesized that the concentration of selected fibrinolysis parameters can vary according to clinicopathological determinants. Thus, the next analysis was made only in patients with breast cancer depending on tumor diameter, TNM staging system, tumor localization, and grade according to Elston-Ellis, nodal status, histological type, molecular type, and proliferation index – Ki-67 (Table 6). With respect to tumor diameter, BrC patients were divided into two subgroups T1 (tumor diameters <20 mm) and T2 (tumor diameter ≥20 mm and <50 mm). Also, based on the TNM staging system, the study group was split into IA+IB and IIA+IIB. Higher fibrinolytic potential in T2 and IIA+IIB cancers was observed but a higher anti-fibrinolytic profile in T1 and IA+IB tumors was noted (p=0.0171, p=0.0189, respectively). A substantial tendency to higher concentration of t-PA was noted in T2, stage IIA+IIB as well as in lymph nodes involvement tumors (p=0.0608, p=0.0624, p=0.0806, respectively). Additionally, a growing tendency to a higher

Table 3. Plasma levels of tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), as well as t-PA/PAI-1 and PAI-1/t-PA ratios in all cases.

| Parameter [units] | Study group N=60 | Control group N=45 | p-value |
|-------------------|-----------------------|----------------------|---------------|
| t-PA [ng/ml] | 4.51 3.23/6.19 | 4.45 2.65/5.79 | 0.5977 |
| PAI-1 [ng/ml] | 39.45 27.92 /53.13 | 33.91 22.63/45.69 | 0.0494 |
| t-PA/PAI-1 | 0.12 0.06/0.18 | 0.13 0.08/0.20 | 0.2504 |
| PAI-1/t-PA | 8.49 5.48/16.82 | 7.92 5.07/12.64 | 0.2504 |

Data are expressed as median (Me) and the inter-quartile range (IQR) [lower quartile (Q1)/upper quartile (Q3)]; t-PA – tissue plasminogen activator; PAI-1 – plasminogen activator inhibitor type 1; a significant difference is denoted by bold p-value

t-PA/PAI-1 ratio and a lower PAI-1/t-PA ratio in lymph nodes involvement tumors ($p=0.0738$) was noted.

Fibrinolytic elements as predictors of breast cancer morbidity. The ROC curves for separate laboratory parameters were constructed and the areas under the curve with 95% confidence interval were established (AUC, 95% CI thresholds with sensitivity [SE] and specificity [SP]). We estimated the ROC curves in order to determine the diagnostic accuracies of fibrinolysis system elements: t-PA, PAI-1, and the ratios of t-PA/PAI-1 and PAI-1/t-PA in the prediction of breast cancer morbidity. The borderline of the diagnostic usefulness of the test, based on the area under the ROC curve ($AUC^{ROC} \geq 0.5$; $p < 0.05$ was reached only for PAI-1. Although the AUC^{ROC} for t-PA and PAI-1/t-PA ratio was above 0.5, the p-values did not reach significances, thus the Youden Index cut-off points were not identified. Based on the AUC^{ROC} , the Youden Index cut-off value was established to maximize the sum of sensitivity and specificity. PAI-1 concentration presents the most accurate prognostic value with an $AUC^{ROC}=0.606$ (95% CI: 0.5087–0.7482). Using the Youden Index cut-off value, we identified a plasma PAI-1 concentration of 33.91 ng/ml with a sensitivity of 90% and a specificity of 36% as the best cut-off value to discriminate between healthy individuals from breast cancer cases (Figure 1).

Fibrinolytic elements as predictors of breast cancer recurrence. Furthermore, in order to evaluate the diagnostic power of plasma levels of t-PA, PAI-1, and t-PAI-1/PAI-1 and PAI-1/t-PA ratios for prediction of disease relapse among the invasive breast cancer patients, further analysis has been made. The highest value of AUC^{ROC} was obtained for the t-PA concentration and AUC^{ROC} was 0.634 ($AUC \geq 0.5$; 95% CI: 0.5138–0.7665). The cut-off point for the t-PA concentration was set at 5.3 ng/ml with 66% specificity and 70% sensitivity, this value distinguishes disease recurrence patients and non-disease relapse subjects (Figure 2).

Cut-off points of t-PA concentration and PAI-1/t-PA ratio as the best predictors of breast cancer recurrence. Figure 3 demonstrates the Kaplan–Meier PFS curves for breast cancer patients stratified on the basis of plasma t-PA concentration. As shown, a baseline elevated plasma t-PA level had a negative prognostic impact in terms of PFS (PFS rates 75% vs. 91%; $p < 0.0377$). The significant p-value indicates that patients with a pre-operative higher concentration of t-PA than 5 ng/ml present worse future outcomes. Twenty-eight patients (47%) demonstrated a baseline concentration of t-PA above 5 ng/ml, whereas 32 cases (53%) had a lower than 5 ng/ml concentration of t-PA. Recurrence of the disease in the group of patients with a higher concen-

Table 4. Plasma concentrations of tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), as well as t-PA/PAI-1 and PAI-1/t-PA ratios in the study group and controls according to age <55 years and ≥ 55 years.

| Parameter [units] | < 55 years | | | ≥ 55 years | | |
|-------------------|----------------------|----------------------|---------------|----------------------|----------------------|---------|
| | Study group N=35 | Control group N=27 | p-value | Study group N=25 | Control group N=18 | p-value |
| t-PA [ng/ml] | 4.42 3.15/5.87 | 4.45 3.20/5.42 | 0.9614 | 5.38 3.45/6.34 | 4.01 2.13/6.88 | 0.5053 |
| PAI-1 [ng/ml] | 39.50 28.93/64.65 | 32.69 18.82/45.98 | 0.0125 | 39.39 24.40/44.60 | 37.10 26.88/44.15 | 0.8176 |
| t-PA/PAI-1 | 0.11 0.05/0.16 | 0.13 0.09/0.23 | 0.0554 | 0.13 0.07/0.25 | 0.11 0.06/0.18 | 0.5556 |
| PAI-1/t-PA | 9.28 6.20/19.78 | 7.88 4.30/11.70 | 0.0554 | 7.47 4.06/14.67 | 8.96 5.49/17.57 | 0.5556 |

Data are expressed as median (Me) and the inter-quartile range (IQR) [lower quartile (Q1)/upper quartile (Q3)]; t-PA – tissue plasminogen activator; PAI-1 – plasminogen activator inhibitor type 1; a significant difference is denoted by bold p-value

Table 5. Plasma concentrations of tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), as well as t-PA/PAI-1 and PAI-1/t-PA ratios in the study and control groups based on BMI <24.99 kg/m² and ≥ 24.99 kg/m².

| Parameter [units] | < 24.99 kg/m ² | | | ≥ 24.99 kg/m ² | | |
|-------------------|---------------------------|----------------------|---------|--------------------------------|----------------------|---------|
| | Study group N=37 | Control group N=27 | p-value | Study group N=23 | Control group N=18 | p-value |
| t-PA [ng/ml] | 4.46 3.44/6.16 | 4.32 2.13/5.95 | 0.5229 | 4.55 2.74/6.22 | 4.59 3.40/5.77 | 0.9686 |
| PAI-1 [ng/ml] | 36.50 26.42/45.48 | 33.91 21.17/46.27 | 0.3015 | 42.91 37.20/64.65 | 33.84 26.14/45.69 | 0.0902 |
| t-PA/PAI-1 | 0.13 0.07/0.22 | 0.13 0.07/0.22 | 0.5497 | 0.10 0.05/0.16 | 0.13 0.09/0.20 | 0.2219 |
| PAI-1/t-PA | 7.82 4.56/14.85 | 7.99 4.48/13.47 | 0.5497 | 9.87 6.20/19.91 | 7.88 5.07/11.32 | 0.2219 |

Data are expressed as median (Me) and the inter-quartile range (IQR) [lower quartile (Q1)/upper quartile (Q3)]; BMI - body mass index; t-PA - tissue plasminogen activator; PAI-1 - plasminogen activator inhibitor type 1; a significant difference is denoted by bold p-value

Table 6. Concentrations of selected fibrinolytic parameters depending on clinicopathological determinants in all breast cancer cases.

| Analyzed variables | t-PA concentration p-value | PAI-1 concentration p-value | t-PA/PAI-1 ratio p-value | PAI-1/t-PA ratio p-value |
|--|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Tumor diameter | 4.23 | 40.91 | 0.10 | 10.08 |
| T1 (<20 mm) | 2.74/5.98 | 28.10/56.19 | 0.04/0.16 | 6.25/22.54 |
| Tumor diameter | 5.38 | 37.55 | 0.16 | 6.21 |
| T2 (≥20 mm and <50 mm) | 3.92/7.47 <u>p=0.0608</u> | 27.31/44.60 p=0.3054 | 0.12/0.25 p=0.0171 | 4.06/8.51 p=0.0171 |
| Stage of disease IA+IB | 4.26 | 40.86 | 0.10 | 9.98 |
| | 2.74/5.98 | 28.10/56.19 | 0.04/0.16 | 6.25/22.54 |
| Stage of disease IIA+IIB | 5.54 | 38.04 | 0.17 | 5.99 |
| | 3.92/7.47 <u>p=0.0624</u> | 27.31/44.60 p=0.3837 | 0.12/0.25 p=0.0189 | 4.06/8.51 p=0.0189 |
| Localization of the tumor – left breast | 4.51 | 43.76 | 0.11 | 9.31 |
| | 3.21/6.44 | 28.93/56.19 | 0.06/0.16 | 6.11/16.49 |
| Localization of the tumor – right breast | 4.49 | 37.88 | 0.13 | 7.64 |
| | 3.24/6.01 p=0.6467 | 24.18/45.10 p=0.1260 | 0.06/0.25 p=0.5106 | 4.06/17.14 p=0.5106 |
| Grade according to Elston-Ellis – 1+2 | 4.44 | 39.70 | 0.12 | 8.49 |
| | 3.24/6.01 | 27.31/53.24 | 0.06/0.18 | 5.67/17.14 |
| Grade according to Elston-Ellis – 3 | 5.51 | 38.35 | 0.13 | 8.15 |
| | 3.15/7.25 p=0.5127 | 28.93/53.01 p=0.9763 | 0.06/0.19 p=0.7435 | 5.29/15.82 p=0.7435 |
| Nodal status – positive | 5.27 | 37.20 | 0.14 | 7.02 |
| | 4.14/6.25 | 22.40/56.19 | 0.09/0.26 | 3.81/11.43 |
| Nodal status – negative | 4.28 | 40.80 | 0.11 | 9.34 |
| | 2.62/6.01 <u>p=0.0806</u> | 28.10/53.01 p=0.5439 | 0.05/0.16 <u>p=0.0738</u> | 6.11/20.63 <u>p=0.0738</u> |
| Histological type – IDC | 4.51 | 40.40 | 0.11 | 8.80 |
| | 3.24/6.25 | 27.73/53.24 | 0.06/0.18 | 5.67/16.49 |
| Histological type – ILC | 4.49 | 33.75 | 0.13 | 7.85 |
| | 2.74/5.26 p=0.5321 | 28.10/42.91 p=0.2151 | 0.05/0.22 p=0.8817 | 4.56/19.91 p=0.8817 |
| Molecular type – luminal A | 4.46 | 39.39 | 0.11 | 9.35 |
| | 3.24/6.22 | 30.45/48.12 | 0.06/0.19 | 5.16/16.48 |
| Molecular type – other subtypes* | 4.61 | 39.50 | 0.14 | 7.03 |
| | 3.21/6.16 p=0.7960 | 27.73/64.65 p=0.8433 | 0.06/0.18 p=0.9515 | 5.67/17.14 p=0.9515 |
| Ki-67 (%) <14 | 4.46 | 39.39 | 0.10 | 9.68 |
| | 3.04/6.22 | 30.45/48.12 | 0.06/0.19 | 5.16/16.48 |
| Ki-67 (%) ≥15 | 4.61 | 39.50 | 0.14 | 7.03 |
| | 3.44/6.16 p=0.4962 | 27.73/53.24 p=0.8014 | 0.06/0.18 p=0.6787 | 5.67/17.14 p=0.6787 |

Data are expressed as median (Me) and the inter-quartile range (IQR) [lower quartile (Q1)/upper quartile (Q3)]; t-PA – tissue plasminogen activator; PAI-1 – plasminogen activator inhibitor type 1; IDC – invasive ductal carcinoma; ILC – invasive lobular carcinoma; Other molecular subtypes include Luminal B HER2 (negative and positive); Non-luminal HER2 (positive); Triple-negative; Ki-67– proliferation marker; significant differences are denoted by bold p-value; the underlined p-value represents closeness to statistical significance

tration of t-PA occurred in seven out of 28 (25%). However, in the group with a lower baseline concentration of t-PA, 3 out of 32 (9%) cases had a recurrence of the disease.

Figure 4 presents the Kaplan–Meier PFS curves for the breast cancer patients analyzed on the basis of plasma PAI-1 concentration. According to this analysis, a PAI-1 does not predict disease relapse (p=0.2282).

Figure 5 presents the Kaplan–Meier PFS curves for the breast cancer patients analyzed on the basis of the PAI-1/t-PA ratio. As shown, a lower PAI-1/t-PA ratio characterized a negative prognostic influence with respect to PFS (PFS rates 74% vs. 91%; p<0.0377). A lower PAI-1/t-PA ratio than 7.5 is

associated with a shorter survival rate. Thirty-three patients (55%) demonstrated a baseline PAI-1/t-PA ratio above 7.5, whereas 27 cases (45%) had a lower than 7.5 the PAI-1/t-PA ratio. Recurrence of the disease in the group of patients with a higher PAI/t-PA ratio occurred in three out of 33 (9%). However, in the group with a lower baseline PAI-1/t-PA ratio, 7 out of 27 (26%) cases had a recurrence of the disease.

Discussion

Breast cancer still remains an important socio-economic problem worldwide. The morbidity and mortality rates in

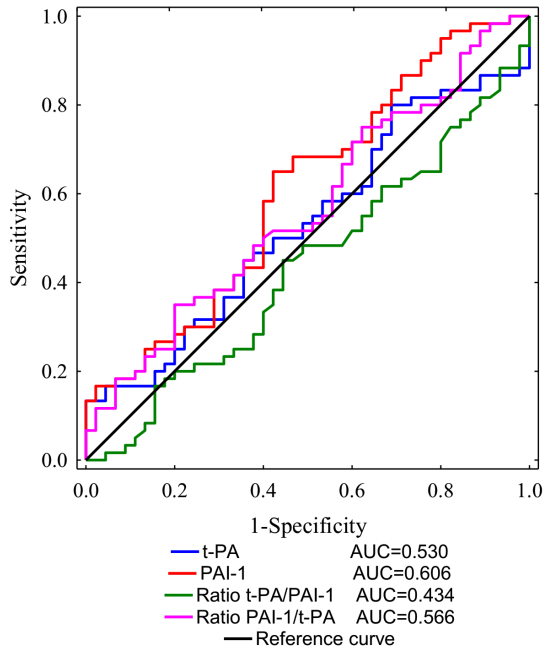


Figure 1. Four ROC curves and AUC values of examined parameters were designed in order to discriminate breast cancer cases from healthy individuals.

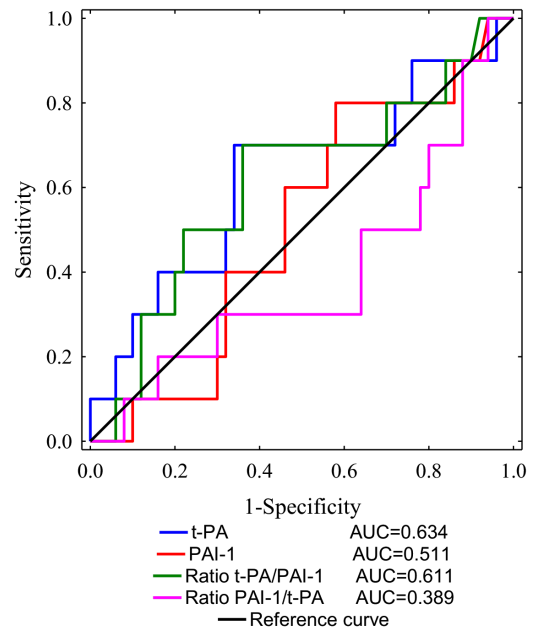


Figure 2. Four ROC curves and AUC values for plasma levels of t-PA, PAI-1, as well as t-PA/PAI-1 and PAI-1/t-PA ratios among BrC patients were established in order to distinguish disease recurrence patients and non-disease relapse subjects.

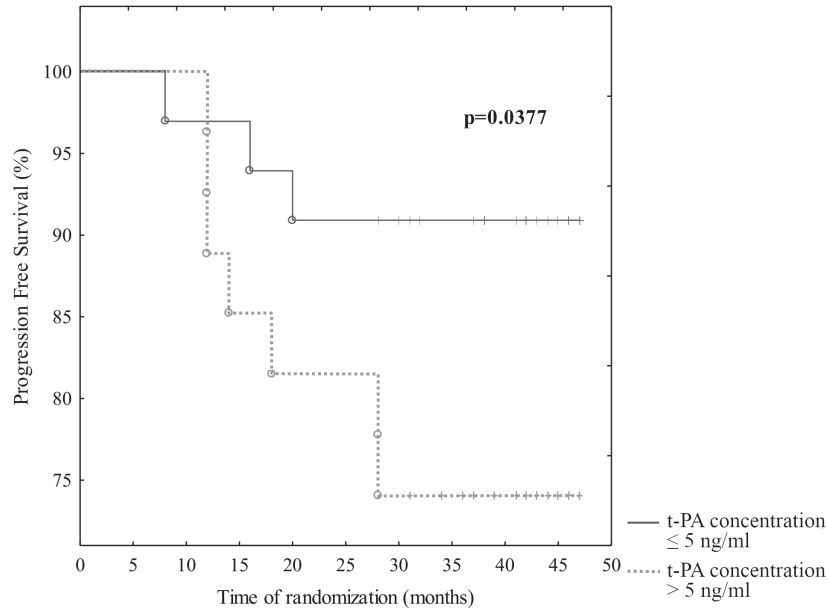


Figure 3. Kaplan-Meier curves of progression-free survival (PFS) of patients with breast cancer. Comparison between patients with low and high plasma t-PA levels (cut-off ≤ 5 ng/ml).

recent years have dramatically increased to over two million newly diagnosed cases, constituting of 25.4% the total number of new cases diagnosed in 2018 [1]. The development of new diagnostic and screening tests as well as modern therapeutic strategies led to enhance relative survival rates

(over 85% of BC five-year survivors after diagnosis). A relevant amelioration of survival is associated with early diagnosis and application of adjuvant therapy. However, breast cancer is a remarkably heterogeneous neoplasm, and in order to optimize health care, the complete histopatho-

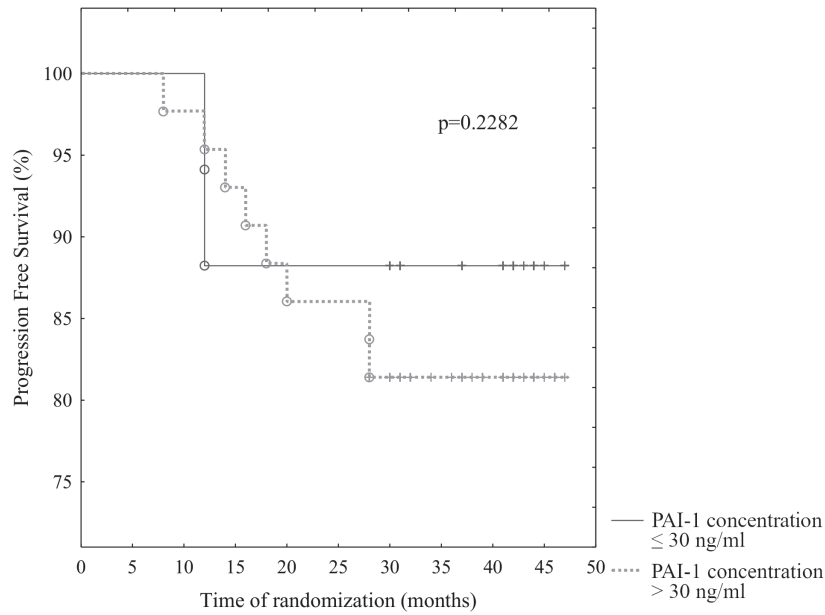


Figure 4. Kaplan-Meier curves of progression-free survival (PFS) of patients with breast cancer. Comparison between patients with low and high plasma PAI-1 levels (cut-off ≤30 ng/ml).

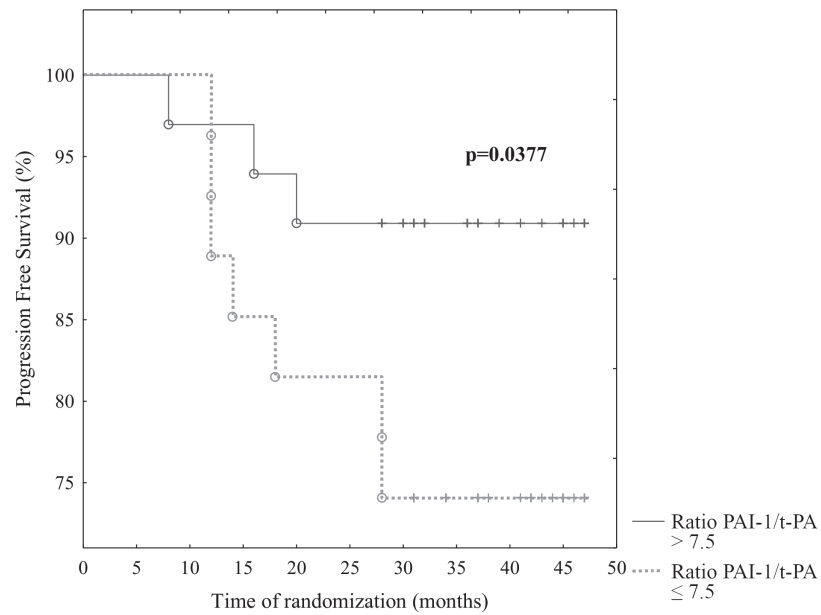


Figure 5. Kaplan-Meier curves of relapse-free survival (RFS) of patients with breast cancer. Comparison between patients with low and high PAI-1/t-PA ratio (cut-off ≤7.5).

logical and molecular examination should be performed to adequately categorize BrC [19]. Important risk factors such as age, BMI value, genetic susceptibility and family predispositions, use of menopausal hormone therapy or early menses, and late menopause play a fundamental role in breast cancer patients' treatment strategy [1, 19].

Reliable markers of recurrence and response to treatment are still sought out. Thus, we focused in this study on the analysis of two major compounds of the fibrinolytic process, which exert opposite function in clot lysis regulation: tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) with respect to clinicopath-

ological factors and we estimated the diagnostic accuracy of examined parameters for the disease recurrence prediction in breast cancer cases. In our study, we observed that the concentration of PAI-1 was higher in breast cancer cases compared to controls. Further detailed analysis revealed that in BrC patients below the age of 55, a significantly higher PAI-1 concentration was noted than in healthy individuals. This observation may indicate the anti-fibrinolytic phenotype and a possible higher pro-thrombotic risk in breast cancer patients. In natural conditions the PAI-1 inhibits t-PA, thus should suppress cancer progression. However, in the malignant process paradoxical phenomenon is observed, indicating that a PAI-1 promotes cancer progression including tumor cell adhesion, migration, invasion, and angiogenesis, thus contributing to the increased cancer aggressiveness [9, 20]. A partial explanation for this paradox is based on the PAI-1 concentration. It means that a PAI-1 can be pro-angiogenic or anti-angiogenic depending on its concentration [21]. However, due to the non-hemostatic function of PAI-1, it may be a negative prognostic factor for those subjects. Interestingly, in our study only in healthy women, we observed age-dependent elevation of PAI-1, suggesting that in breast cancer patients a neoplastic process regulates PAI-1 level independently on well-defined factors. Since aging is associated with a progressive impairment of the fibrinolytic system expressed by increased releasing of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) [22].

Additionally, our results demonstrated that PAI-1 had the highest AUC^{ROC} from all the examined parameters, suggesting that PAI-1 may be a good diagnostic biomarker of breast cancer morbidity. The receiver-operating characteristic curve identified the PAI-1 concentration of 33.91 ng/ml, with 36% specificity and 90% sensitivity, as the best cut-off value to discriminate between healthy women and breast cancer patients. Our findings indicate the relevant usefulness of PAI-1 evaluation in the differentiation between breast cancer patients and non-cancerous cases. PAI-1 exerts a pro-angiogenic and anti-angiogenic activity and the ability to inhibit malignant cells apoptosis [19, 23]. The diminishing of the apoptotic process could thus increase the survival rate of cancer cells during dissemination, therefore increasing the possibility for the formation of secondary disease site [19]. The second perspective coming from overexpression of PAI-1 is the risk of VTE due to hypofibrinolysis and prolongation of clot lysis. It is well-known that cancer-related thrombosis is connected with worse clinical outcomes [24]. Despite the scientific consensus that PAI-1 expression presents prognostic and predictive value, still, the immunoassay evaluation of PAI-1 is not commonly applied in clinical practice [9].

It is well-established that the natural function of t-PA is the stimulation of the conversion of plasminogen into plasmin. The consequence of this reaction is an enhancement of plasmin generation, which can lead to direct induction of the disintegration of several connective tissues and extracel-

lular matrix proteins including fibrin, laminin, fibronectin, and perlecan. All of these reactions lead to further activation of certain growth factors leading to the pro-angiogenic phenotype [19, 25]. Plasmin, as well as a t-PA, can activate VEGF, fibroblast growth factor-2 (FGF2), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), hepatocyte growth factor (HGF) and so on, which promote new vessel network formation, subsequently support a tumor growth, invasion, and metastasis [12, 23]. Thus, t-PA is involved in the formation of metastases, by the degradation of the basal membrane and extracellular matrix allowing cancer cells to spread to distant sites. In addition, t-PA is attributed to the ability to stimulate cancer cell proliferation, motility, and metastasis [10, 11, 19]. Our study confirms mentioned role of t-PA in cancer biology since a higher fibrinolytic potential in T2 and IIA+IIB cancers was observed, but a higher anti-fibrinolytic profile (PAI-1/t-PA) in T1 and IA+IB tumors was noted. An essential tendency to a higher concentration of t-PA was noted in T2, stage IIA+IIB as well as in lymph nodes positive tumors. Additionally, a growing tendency to a higher t-PA/PAI-1 ratio and a lower PAI-1/t-PA ratio in lymph nodes involvement tumors was reported. Based on our study, we suggest that bigger and more advanced tumors demonstrate a higher t-PA concentration and a higher fibrinolytic potential as well as a lower anti-fibrinolytic profile. Furthermore, according to the Kaplan-Meier curves, we suggest that a higher concentration of t-PA >5 ng/ml as well as a lower PAI-1/t-PA ratio <7.5 may indicate a more aggressive character of the tumor and a high possibility of breast cancer dissemination. This suggestion is based on the relapse rates of 25% and 26%, respectively, in BrC cases. Furthermore, our study indicates that the baseline concentration of t-PA and PAI-1 may be used as appropriate, easy-applicable prognostic indicators next to tumor-related determinants such as tumor diameter, TNM staging system, or nodal status.

Apart from Kaplan-Meier curves, these results were supported by further statistical analysis (ROC curves), which also indicates that in patients with higher concentrations of t-PA, the higher rate of disease relapse occurs. t-PA concentration reached the highest $AUC^{ROC}=0.634$ ($AUC \geq 0.5$; 95% CI: 0.5138–0.7665). The cut-off point for the t-PA concentration was identified at 5.3 ng/ml with 66% specificity and 70% sensitivity, in order to discriminate between disease recurrence patients and those without disease relapse. To date, there are only a few trials focusing on the prognostic relevance of plasma t-PA in the early-stage of BrC, and consensus in cut-off points does not exist. However, our results related to the t-PA level are inconsistent with the study by Corte et al. They noted a lower concentration of tissue plasminogen activator in large size and low differentiated tumors, compared to T1 (tumor diameter <2 cm) and well-differentiated cancers. The authors claim that the low concentration of t-PA in breast cancer cases is associated with higher aggressiveness of cancer cells and poor future prognosis for patients [14]. This discrepancy seems surprising, but most

likely it is due to the fact that Corte et al. used a solid-phase enzyme immunoassay in tumor cytosol samples to measure of t-PA, whereas in the current study, we used 'liquid biopsy' as biological material. In our study longer PFS was associated with a lower than 5 ng/ml a pre-surgical plasma concentration of t-PA. Teliga-Czajkowska et al. analyzed 60 ovarian cancer cases. The authors divided patients into two subgroups with low t-PA concentration (37 subjects with below 6.5 mg/l) and with higher t-PA level (23 subjects with above 6.5 mg/ml). Patients with baseline t-PA >6.5 mg/l demonstrated a significantly lower probability of 5-year survival [26], which is in line with our results. However, in the era of reference values reduction, based on our study we postulate to narrow the cut-off point for t-PA concentration up to 5 ng/ml. Thanks to this action, it will be possible to earlier recognize patients with relapse disease.

There are some limitations to our study that need to be acknowledged. The main disadvantage of the present study is the size of the study population that might have weakened the statistical power. Thus, the present results limited the ability to generalize. On the other hand, the strength of our research is expressed by the use of samples collected and processed using standard operating procedures. Additionally, in late-stage cancer patients, numerous factors associated with cancer status might affect of fibrinolytic parameters. Hence, the elimination of patients with late-stage BrC allowed us to investigate specifically the association between stage IA–IIB of BrC and t-PA and PAI-1 levels, regardless of the crucial confounders. Also, we excluded cases with obesity, due to the fact that adipose tissue is a well-known source of PAI-1. Taken together, the investigation group is more homogenous.

In summary, the present prospective study demonstrated that pre-surgical t-PA and PAI-1 concentrations are able to serve as both predictive and prognostic markers in early-stage breast cancer.

Acknowledgments: This study has been supported by the Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Poland. We would like to thank all of the patients for participating in our study.

References

- [1] AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Facts & Figures 2017–2018. American Cancer Society, Inc., Atlanta 2017. Accessed at <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/breast-cancer-facts-figures.html>
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA et al. 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. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [3] FAGUET GB. A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. *Int J Cancer* 2015; 136: 2022–2036. <https://doi.org/10.1002/ijc.29134>
- [4] LAKHTAKIA R. A brief history of breast cancer: Part I: Surgical domination reinvented. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2014; 14: e166–169.
- [5] MAKKI J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin Med Insights Pathol* 2015; 8: 23–31. <https://doi.org/10.4137/CPath.S31563>
- [6] VUONG D, SIMPSON PT, GREEN B, CUMMINGS MC, LAKHANI SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch* 2014; 465: 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>
- [7] IKUSHIMA S, ONO R, FUKUDA K, SAKAYORI M, AVANO N et al. Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis. *Jpn J Clin Oncol* 2016; 46: 204–208. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyv165>
- [8] KATO T, YASUDA K, IIDA H, WATANABE A, FUJIUCHI Y et al. Trousseau's syndrome caused by bladder cancer producing granulocyte colony-stimulating factor and parathyroid hormone-related protein: A case report. *Oncol Lett* 2016; 12: 4214–4218. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5152>
- [9] FERRONI P, ROSELLI M, PORTARENA I, FORMICA V, RIONDINO S et al. Plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels in breast cancer - relationship with clinical outcome. *Anticancer Res* 2014; 34: 1153–1161.
- [10] FOX SB, GENERALI DG, HARRIS A. Breast tumour angiogenesis. *Breast Cancer Res* 2007; 9: 216. <https://doi.org/10.1186/bcr1796>
- [11] BALUKA D, URBANEK T, LEKSTAN A, SWIETOCHOWSKA E, WIADERKIEWICZ R et al. The role of the tissue plasminogen activator as a prognostic and differentiation factor in patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *J Physiol Pharmacol* 2016; 67: 93–101.
- [12] DUAN P, NI C. t-PA stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/p38 signaling pathways. *Pharmazie* 2014; 69: 70–75.
- [13] RHONE P, RUSZKOWSKA-CIASTEK B, BIELAWSKI K, BRKIC A, ZARYCHTA E et al. Comprehensive analysis of haemostatic profile depending on clinicopathological determinants in breast cancer patients. *Biosci Rep* 2018; 38: BSR20171657. <https://doi.org/10.1042/BSR20171657>
- [14] CORTEMD, VEREZP, RODRIGUEZJC, ROIBASA, DOMINGUEZ ML et al. Tissue-type plasminogen activator (tPA) in breast cancer: relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90: 33–40. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-2624-x>
- [15] WU J, STRAWN TL, LUO M, WANG L, LI R et al. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenic signaling by uncoupling vascular endothelial growth factor receptor-2- α V β 3 integrin cross talk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 111–120. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304554>
- [16] PLACENCIO VR, DECLARCK YA. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer: Rationale and insight for future therapeutic testing. *Cancer Res* 2015; 75: 2969–2974. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0876>
- [17] EDGE S, BYRD DR, COMPTON CC, FRITZ AG, GREENE F et al (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th Edition. Springer-Verlag, New York 2010, p 718. ISBN 978-0-387-88442-4

- [18] ZARYCHTA E, RHONE P, BIELAWSKI K, ROŚĆ D, SZOT K 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. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.6.06>
- [19] GOURI A, DEKAKEN A, EL BAIRI K, AISSAOUI A, LAABED N et al. Plasminogen activator system and breast cancer: Potential role in therapy decision making and precision medicine. *Biomark Insights* 2016; 11: 105–111. <https://doi.org/10.4137/BMI.S33372>
- [20] MASHIKO S, KITATANI K, TOYOSHIMA M, ICHIMURA A, DAN T et al. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2015; 16: 253–260. <https://doi.org/10.1080/15384047.2014.1001271>
- [21] LI S, WEI X, HE J, TIAN X, YUAN S et al. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer research. *Biomed Pharmacother* 2018; 105: 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.119>
- [22] YAMAMOTO K, TAKESHITA K, KOJIMA T, TAKAMATSU J, SAITO H. Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.11.013>
- [23] DUFFY MJ, MCGOWAN PM, HARBECK N, THOMSEN C, SCHMITT M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res* 2014; 16: 428. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0428-4>
- [24] HISADA Y, MACKMAN N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood* 2017; 130: 1499–1506. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-743211>
- [25] FERRARIS GM, SIDENIUS N. Urokinase plasminogen activator receptor: a functional integrator of extracellular proteolysis, cell adhesion, and signal transduction. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39: 347–355. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1334485>
- [26] TELIGA-CZAJKOWSKA J, SIENKO J, JALINIK K, SMO-LARCZYK R, CZAJKOWSKI K. Prognostic value of tissue plasminogen activator (tPA) in patients with epithelial ovarian cancer undergoing chemotherapy. *Ginekol Pol* 2019; 90: 235–241. <https://doi.org/10.5603/GP.a2019.0043>

Wprowadzenie do badania opublikowanego w pracy nr 2:

Kwiatkowska K, Rhone P, Wrzeszcz K, Ruszkowska-Ciastek B. High post-treatment leptin concentration as a prognostic biomarker of the high risk of luminal breast cancer relapse: A six-year comprehensive study. *Life (Basel)*. 2022;12(12):2063. IF: 3,20; punktacja MNiSW: 70.000

Luminalny A i B rak piersi stanowi około dwie trzecie wszystkich nowotworów piersi. Jest to wysoce niejednorodny nowotwór charakteryzujący się różnym stanem histologicznym, profilem ekspresji genów oraz zróżnicowanym przebiegiem klinicznym i odpowiedzią na leczenie. Pomimo leczenia uzupełniającego, u pacjentów z wysokim ryzykiem nawrotu, nadal występują zarówno wczesne jak i późne wznovy choroby. Stąd, lekarze nieustannie poszukują czułych parametrów prognostycznych, które mogą pomóc w przewidywaniu prawdopodobieństwa progresji choroby i krótszego przeżycia pacjentek.

W trakcie rozwoju otyłości, zwiększone uwalnianie adipokin o działaniu prozapalnym (np. leptyny) i zmniejszenie adipokin o działaniu przeciwzapalnym (np. adiponektyny) powoduje powstanie przewlekłego stanu zapalnego, który predysponuje do rozwoju zaburzeń metabolicznych (insulinooporność, cukrzyca typu 2 i choroby układu krążenia) oraz nowotworów. Przewlekły stan zapalny wywołany nadmiernym gromadzeniem się tkanki tłuszczowej powoduje przebudowę jej mikrośrodowiska, czyli zwłóknienie i angiogenezę, prowadzące do powstania środowiska proonkogenego.

Uważa się, że podwyższone stężenie leptyny bierze udział we wzroście i inwazji komórek nowotworowych poprzez zwiększoną ekspresję VEGF i modulację receptora estrogenowego α , który stymuluje ekspresję aromatazy i w konsekwencji zwiększa stężenie estrogenów. Ponadto, uważa się, że podwyższona ekspresja leptyny w nowotworach piersi ma związek z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu. Adiponektyna wykazuje odwrotne działanie w stosunku do leptyny, czyli wykazuje działanie przeciwnowotworowe, w tym przeciwmigracyjne, antyproliferacyjne i proapoptotyczne. U osób otyłych stężenie adiponektyny w osoczu jest obniżony w porównaniu z osobami o prawidłowej masie ciała. Różne badania wskazują, że u kobiet z hipoadiponektynemią guzy piersi mogą wykazywać bardziej agresywny fenotyp, niezależnie od statusu receptorów hormonalnych, na przykład ze

względu na duży rozmiar guza, wysoki stopień złośliwości histologicznej oraz zwiększoną angiogenezę i wyższy potencjał do tworzenia przerzutów.

W publikacji nr 2 badaniem objęto 70 wcześniej nieleczonych pacjentek z klinicznie i histologicznie potwierdzonym rakiem piersi luminalnym A lub B, we wczesnym stadium (IA–IIB). Szczegółowe informacje odnośnie charakterystyki grupy badanej zostały zawarte na rycinie 20. Głównym kryterium włączenia był potwierdzony histopatologicznie, pierwotny, jednostronny, inwazyjny, luminalny A lub B rak piersi, bez przerzutów, we wczesnym stadium (IA–IIB). Głównymi kryteriami wyłączenia były: rak in situ, guz większy niż 5 cm, stopień zaawansowania IIIA lub wyższy, zastosowane wcześniej leczenie neoadjuwantowe, rak miejscowo zaawansowany lub z przerzutami, potrójnie ujemny lub HER2-dodatni nowotwór piersi. Pacjentki obserwowano od momentu rozpoznania raka piersi do daty wystąpienia wznowy lub śmierci lub do stycznia 2022 r., w zależności od tego, co nastąpiło wcześniej. Mediana czasu obserwacji wyniosła 68,5 miesiąca. W trakcie analizy wystąpiło 11 zdarzeń, 1 przerzut odległy i 10 zgonów (współczynnik wznowy wyniósł 15,71%).

Celem badania było zbadanie wartości prognostycznej stężeń adiponektyny i leptyny w surowicy przed i po leczeniu u pacjentek z luminalnym rakiem piersi na podstawie sześciolietniej obserwacji. W tym badaniu wykorzystano analizę Kaplana-Meiera, analizę regresji logistycznej i liniowej oraz krzywą ROC do oszacowania dokładności potencjalnego modelu prognostycznego w celu potwierdzenia wstępnej hipotezy.

Wśród pacjentek z grupy badanej dominował typ luminalny A raka piersi (50 pacjentek (71%)). Mediana wieku wyniosła 54,5 lat, mediana BMI 25,06 kg/m², a mediana wielkości guza 1,5 cm. Spośród 70 kobiet, 26 (37%) było przed menopauzą, a 44 (63%) po menopauzie. W klasyfikacji raka piersi TNM w stadium T1 było 48 chorych (69%), a w T2 – 22 chorych (31%). Analizując typ histologiczny raka piersi, u 61 pacjentek stwierdzono inwazyjnego raka przewodowego, a u 9 – inwazyjnego raka zrazikowego. Tylko 17 (24%) z 70 pacjentek miała potwierdzone przerzuty do lokalnych węzłów chłonnych.

W wyniku przeprowadzonych analiz statystycznych **w drugiej publikacji** porównano cechy kliniczno-patologiczne w odniesieniu do stężeń leptyny i adiponektyny przed i po leczeniu. Stężenia leptyny po leczeniu były wyższe niezależnie od czynników kliniczno-patologicznych w odniesieniu do poziomów leptyny przed leczeniem. Stwierdzono istotnie wyższe stężenia leptyny przed leczeniem u pacjentów z nadwagą i otyłością. Ponadto, istotnie wyższe stężenie leptyny po leczeniu zaobserwowano w guzach z ekspresją E-kadheryny.

Ponadto, niezależnie od zastosowanego schematu leczenia stężenie leptyny wzrosło. Stężenia adiponektyny po leczeniu były wyższe niezależnie od czynników kliniczno-patologicznych. U pacjentów z nadwagą i otyłością odnotowano niższe stężenia w porównaniu do pacjentów z prawidłowym BMI w odniesieniu do stężeń adiponektyny przed i po leczeniu. Wyższe stężenie adiponektyny przed leczeniem stwierdzono u pacjentek bezdzietnych lub z 1–2 dziećmi w porównaniu z kobietami, które rodziły trzy i więcej razy oraz u chorych z guzem bez ekspresji E-kadheryny. Biorąc pod uwagę rodzaj zastosowanego leczenia, leczenie chirurgiczne oszczędzające pierś wiązało się ze wyższym stężeniem adiponektyny, podobne wyniki uzyskano w przypadku zastosowania chemioterapii opartej na antracyklinie oraz hormonoterapii z zastosowaniem tamoksyfenu. Zastosowanie terapii skojarzonej z chemioterapią również wiązało się ze zwiększeniem stężenia adiponektyny. Ponadto, wykorzystując analizę korelacji rang Spearmana wykazano, że stężenie leptyny przed leczeniem korelowało dodatnio ze stężeniem leptyny po leczeniu i ujemnie ze stężeniem adiponektyny po leczeniu oraz że stężenie adiponektyny przed leczeniem korelowało dodatnio ze stężeniem adiponektyny po leczeniu.

W następnym etapie analizy statystycznej skonstruowano krzywe ROC w celu oceny wartości prognostycznej badanych stężeń adipokin (przed i po leczeniu) w przewidywaniu przeżycia całkowitego (OS, ang. overall survival) i przeżycia wolnego od progresji choroby (PFS, ang. progression-free survival) wykonano analizy przeżycia Kaplana-Meiera. Uzyskano następujące punkty odcięcia na podstawie mediany: leptyna po leczeniu - 23,66 ng/ml oraz na podstawie krzywej ROC: leptyna po leczeniu -26,88 ng/ml.

Wykorzystując maksymalną wartość wskaźnika Youdena, uznano, że stężenie leptyny po leczeniu wynoszące 26,88 ng/ml przy czułości 88,9% i swoistości 64,9% jest najlepszą wartością odcięcia pozwalającą na rozróżnienie pacjentów z nawrotem choroby i bez nawrotu choroby. Pacjenci ze stężeniem leptyny po leczeniu poniżej 23,66 ng/ml (punkt odcięcia według mediany) mieli znacząco lepszy OS i PFS niż pacjenci ze stężeniem leptyny po leczeniu powyżej 23,66 ng/ml. Pod względem całkowitego przeżycia w grupie kobiet wystąpiło jedno zdarzenie (2,86%) ze stężeniami poniżej 23,66 ng/ml i osiem (22,86%) nawrotów w grupie ze stężeniami powyżej 23,66 ng/ml. Pod względem czasu wolnego od progresji choroby, w grupie kobiet ze stężeniami poniżej 23,66 ng/ml wystąpiły dwa (5,71%) przypadki nawrotów. Zaś w grupie kobiet ze stężeniami powyżej 23,66 ng/ml dziewięć (25,71%) nawrotów. Podobne


wyniki uzyskano dla stężeń leptyny po leczeniu (26.88 ng/ml), przy czym punkt odcięcia określono na podstawie krzywej ROC .

Ostatnim etapem analizy statystycznej było określenie modeli regresji liniowej pomiędzy adipokinami przed i po leczeniu a przeżyciem wolnym od choroby. Nawrót raka piersi był ujemnie powiązany jedynie ze stężeniem leptyny po leczeniu. Niezależnie od skorygowanych czynników wykazały, że wyższe stężenie leptyny po leczeniu było skorelowane z krótszym przeżyciem wolnym od progresji choroby.

Z badania wynika, że terapia uzupełniająca u pacjentek z nowotworem piersi najprawdopodobniej zwiększała poziomy leptyny i adiponektyny, niezależnie od zastosowanego schematu leczenia. Ponadto, wydaje się, że jedynie stężenie leptyny po leczeniu było powiązane z przyszłymi wynikami pacjentów z luminalnym rakiem piersi - stężenie leptyny wyższe niż 26,88 ng/ml (punkt odcięcia ROC) zwiększa prawdopodobieństwo nawrotu i śmiertelność chorobową w tej grupie. Stężenie leptyny przed leczeniem korelowało dodatnio ze stężeniem leptyny i ujemnie ze stężeniem adiponektyny po terapii uzupełniającej, zatem przedoperacyjny profil adipokin może odzwierciedlać jego przyszłe zależności. Niezależnie od zastosowanego modelu regresji liniowej, jedynie poziomy leptyny po leczeniu wykazały implikacje prognostyczne. Konieczne są dalsze badania w celu ustalenia czy oporność na chemioterapię jest przyczyną podwyższonego stężenia leptyny po leczeniu, zwiększonej częstości nawrotów i śmiertelności w grupie pacjentek z rakiem piersi.

Article

High Post-Treatment Leptin Concentration as a Prognostic Biomarker of the High Risk of Luminal Breast Cancer Relapse: A Six-Year Comprehensive Study

Katarzyna Kwiatkowska ^{1,*}, Piotr Rhone ², Katarzyna Wrzeszcz ¹ and Barbara Ruskowska-Ciastek ^{1,*} 

¹ Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum, 85-094 Bydgoszcz, Poland

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

* Correspondence: katarzynakwiatkowska@abs.umk.pl (K.K.); bruszkowska@cm.umk.pl (B.R.-C.)

Abstract: (1) Background: Nowadays, obesity is well-recognised as a significant risk factor for many chronic diseases, for example, hypertension, diabetes, atherosclerosis and cancer. This study is designed to investigate the prognostic value of the pre- and post-treatment serum levels of adiponectin and leptin in luminal A and B invasive breast cancer (IBrC) patients based on six-years follow-up. (2) Methods: Among 70 patients who underwent breast surgery, 35 were Stage I and 35 were Stage II. The concentrations of pre- and post-treatment adiponectin and leptin were evaluated with a specific ELISA kit. The median follow-up was 68.5 months (inter-quartile range (IQR) = 59–72 months) with a recurrence rate of 15.71%. (3) Results: Generally, concentrations of leptin and adiponectin increased after adjuvant therapy. Follow-up showed a significantly higher incidence of disease relapse in IBrC patients with a high post-treatment concentration of leptin (25.71% vs. 5.71% of cases with a low post-treatment concentration of leptin). A post-treatment leptin concentration of 26.88 ng/mL with a specificity of 64.9% and a sensitivity of 88.9% was determined as the best cut-off value to distinguish patients with disease recurrence from those without disease relapse. (4) Conclusions: Our results demonstrated that only the post-treatment serum leptin concentration may be of value as a prognostic indicator and could contribute to predicting a future outcome for patients with early-stage IBrC.

Keywords: leptin; breast cancer; relapse; adiponectin; treatment



Citation: Kwiatkowska, K.; Rhone, P.; Wrzeszcz, K.; Ruskowska-Ciastek, B. High Post-Treatment Leptin Concentration as a Prognostic Biomarker of the High Risk of Luminal Breast Cancer Relapse: A Six-Year Comprehensive Study. *Life* **2022**, *12*, 2063. <https://doi.org/10.3390/life12122063>

Academic Editors: Victoria Cano, Beatriz Merino Palacios and Shinichiro Kashiwagi

Received: 22 October 2022

Accepted: 5 December 2022

Published: 8 December 2022

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



Copyright: © 2022 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/>).

1. Introduction

According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), in 2020 invasive breast cancer (IBrC) had become the most commonly diagnosed type of cancer and the most leading cause of death in women worldwide. The IARC estimates that the incidence of breast cancer will increase by more than a third, to over three million new cases annually by 2040. This increase will be mainly due to demographic factors and lifestyle changes [1]. It is estimated that approximately one-third of postmenopausal breast cancers are associated with a potentially modifiable factor, that is, the accumulation of adipose tissue which is metabolically overactive [2]. In 2000, there were dynamic developments in the technology of genomic analysis and identification of gene expression, which resulted in the approval of a molecular classification of breast cancers. There are now four main subtypes of breast cancer: luminal A, luminal B, non-luminal human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive and triple-negative. The classification is based on the expression of breast cancer markers, i.e., oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER2 and the proliferation marker Ki-67 expressions [3]. The value of Ki-67, which distinguishes luminal A from luminal B tumours, can vary. At a conference in Saint Gallen in 2011, the cut-off point for Ki-67 was set at 14% based on the median; however, in 2013 it was found that a cut-off point only of 20% indicates a higher proliferation risk [4].

Interestingly, adipose tissue is the main component of the breast, but the percentage of adipose tissue varies from person to person, depending on the variability of the lobular and glandular tissue [5]. Adipose tissue exhibits both paracrine and endocrine effects. Adipocytes secrete pro- and anti-inflammatory cytokines, peptide hormones that play an important role in maintaining energy homeostasis and regulating the immune system [6]. During the development of obesity, the increased release of adipokines with pro-inflammatory activity (e.g., leptin) and the decrease of those with anti-inflammatory effects (e.g., adiponectin) establishes a chronic inflammatory state that predisposes an individual to the development of metabolic diseases (insulin resistance, type 2 diabetes and cardiovascular disorders) and cancer. Chronic inflammation induced by excessive adipose tissue accumulation causes remodelling of its microenvironment, that is, fibrosis and angiogenesis leading to a pro-oncogenic environment [7]. Obese individuals demonstrate alterations in oestrogen signalling, mainly in the release of aromatase (the enzyme responsible for converting androgens into oestrogens), leading to the formation and progression of oestrogen-dependent tumours [8]. Obesity is further associated with the increased production of reactive oxygen species (ROS), which may contribute to the initiation of breast cancer through damage to cellular DNA [9]. Adipose tissue assumes the role of the primary component of the tumour microenvironment, and the cooperation between adipocytes and tumour cells is being studied by researchers [7].

Leptin regulates foetal development, reproduction, lactation, bone development, haematopoiesis, the immune response, angiogenesis and proliferation of many different cell types, including breast tissue cells [10]. Leptin expression is also regulated by inflammatory mediators and directly correlates with insulin levels and inversely with glucocorticoid levels, and increases in the course of acute infection and sepsis [11]. Elevated leptin levels are thought to be involved in tumour cell growth and invasion through increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and by modulating the oestrogen receptor α (ER α), which stimulates aromatase expression and consequently increases oestrogen levels [12,13]. Furthermore, elevated leptin expression in IBrC is thought to be involved in higher tumour grades and increased size [14]. Adiponectin demonstrates the opposite effects with respect to leptin, meaning it shows anti-tumour activities including antiproliferative, antimigratory and proapoptotic [13]. Plasma adiponectin levels are reduced in obese compared to normal weight individuals, negatively correlating with BMI (body mass index) [15]. Hypoadiponectinemia in obesity may result from increased production of pro-inflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6), or from negative feedback of adipokine on its own production and the production of its receptors. Low adiponectin levels have been linked to, among other things, an increased risk of developing type 2 diabetes, insulin resistance and various malignancies, including breast cancer [16]. Various studies indicate that in women with hypoadiponectinemia, breast tumours may present a more aggressive phenotype independently of hormone receptor status, for example, by large tumour size, high histological grade and increased angiogenesis and metastasis [13,17]. Studies have analysed that leptin alone or adiponectin alone before treatment have no prognostic values. A different matter is the correlation of these with, for example, BMI [13].

This study is designed to investigate the prognostic value of the pre- and post-treatment serum levels of adiponectin and leptin in luminal A and B IBrC patients based on six-years follow-up. For this study, we used the Kaplan-Meier, logistic and linear regression analyses and the receiver operating characteristic (ROC) curve for estimation of the potential prognostic model's accuracy in order to establish our preliminary hypothesis.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

Seventy previously untreated patients with clinically and histological proven primary stage I–II IBrC were enrolled in the study. The subjects were admitted to the Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre, Prof F. Łukaszczyk Memorial

Hospital, Bydgoszcz, Poland between November 2015 and January 2018. All cases were of Polish descent. Weight and height were collected at admission and the BMI was calculated and expressed as kg/m^2 . The median age of patients was 54.5 years old (IQR = 49.0–59.0). Patients received a complete clinicopathological and post-operative examination and were correctly diagnosed according to invasive standards. A classification based on that of the World Health Organization (WHO) was used to classify the histological type of breast cancer. Tumour stage was determined according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC; 7th edition).

The main inclusion criteria were pathologically proven primary, invasive, unilateral, non-metastatic, early stage (IA–IIB) breast cancer. The cancer-related exclusion criteria were as follows: carcinoma in situ, tumour larger than 5 cm, stage IIIA or higher, neoadjuvant treatment, locally advanced or metastatic cancer, triple-negative, non-luminal HER2 positive IBrC. Figure 1 shows the flowchart of patient recruitment for the study. Other exclusion criteria were morbid obesity (BMI over $40 \text{ kg}/\text{m}^2$) and diabetes mellitus type 2.

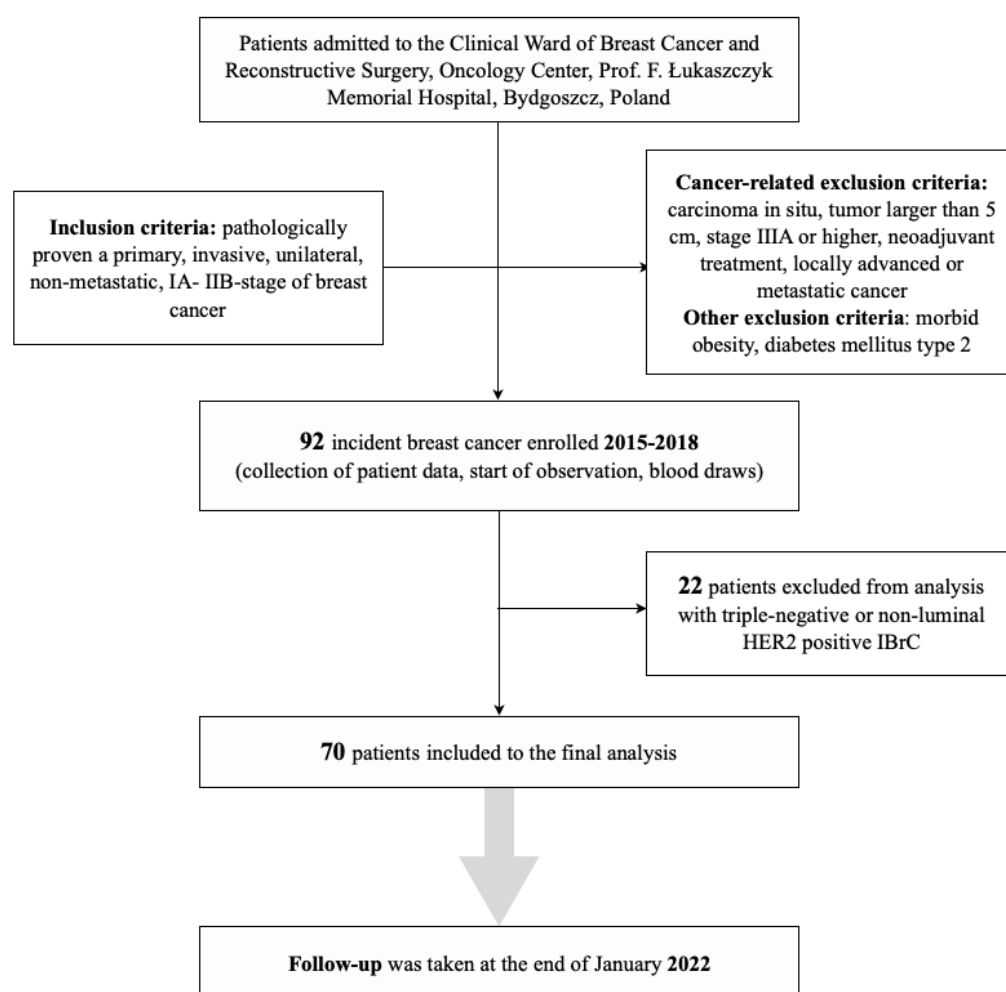


Figure 1. Flowchart of the breast cancer patients selection classification to the study.

2.2. Treatment Standards

All participants were treated according to standard guidelines established by the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines for Practice. Fifty-six cases underwent breast-conserving surgery (BCS), seven had a standard mastectomy and seven had a modified radical mastectomy (MRM). All surgical procedures were carried out according to standard conditions. Sixty-eight women received adjuvant treatment. All study participants were treated with surgery as their primary treatment, followed by adjuvant

therapy consisting of radiotherapy, brachytherapy, hormone therapy, chemotherapy and immunotherapy. Post-operative radiotherapy was delivered mainly in patients after BCS. In the analysed group, post-operative radiotherapy was administered with X photons with energies of 6/15 MeV and a dose of 42.5 gray (Gy) in 17–20 fractions over 4–6 weeks. Additionally, in half of the women, brachytherapy was applied to the tumour bed at a dose of 10 Gy. Adjuvant chemotherapies were anthracycline-containing ($n = 23$) and non-anthracycline ($n = 4$) containing drugs, given in three to six cycles. The type of the endocrine treatment depended on menopausal status; 40 (57%) used tamoxifen (Egis Pharmaceuticals, Budapest, Hungary), 17 (24%) received aromatase inhibitors (AIs) (Arimidex (anastrozole), AstraZeneca, Cambridge, UK) and seven (10%) were given a combination of tamoxifen and AIs. Four (6%) HER2-positive patients were required to receive an adjuvant immunotherapy (trastuzumab).

2.3. Ethical Approval

The study was performed under the appropriate institutional ethics approvals (KB 547/2015) and in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each participant.

2.4. Follow-Up and Survival Status

Patients were followed from the diagnosis of IBrC to the date of breast cancer recurrence or death or until January 2022, whichever came first. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) are presented by Kaplan-Meier graphs. The median follow-up was 68.5 months (IQR = 59–72 months). During the analysis, 11 events occurred, one distant metastasis and ten deaths (recurrence rate was 15.71%).

2.5. Blood Analysis

Venous blood samples were drawn twice into 4.0 mL tubes (Becton Dickinson Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, USA) without anticoagulant in order to determine the concentrations of adiponectin and leptin. 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 at nine months (IQR = 6.0–10.0) after the tumour removal procedure to avoid the direct impacts of chemotherapy or surgical wound healing on the levels of adiponectin and leptin.

Material was collected under strict conditions, that is, fasting (after a 12-h fast) and after a 30-min rest. After mixing the samples, they were centrifuged at $3000 \times g$ at $+4^\circ \text{C}$ for 15 min, aliquoted and stored at -80°C (as specified by the manufacturer) until assayed, but not for more than six months. At the time of the bath analysis, aliquots were limited to one freeze-thaw cycle and storage conditions were maintained.

2.5.1. 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 leptin detection limit 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 before treatment of 12.38 ng/mL, based on the median value, and 16.92 ng/mL according to the ROC cut-off for the whole study population. The post-treatment leptin values were as follows: 23.66 ng/mL (median) and 26.88 ng/mL (ROC cut-off).

2.5.2. Serum Adiponectin Analysis

The 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 adiponectin detection limit was 0.47 ng/mL and had an intra-assay coefficient of variation (within-run) of 3.9% and an inter-assay coefficient of variation (run-to-run) of 6.0%. Patients were divided into having low or high values, dichotomised using a cut-off for pre-treatment adiponectin of 27.2 ng/mL, based on the median value, and 28.49 ng/mL according to the ROC cut-off for the whole study population. The post-treatment adiponectin values were as follows: 32.37 ng/mL (median) and 32.88 ng/mL (ROC cut-off).

2.6. Statistical Methods

Statistical analysis was conducted using Statistica version 13.1 (StatSoft®, Cracow, Poland). The Shapiro-Wilk test was used to check the normality of the data distribution. Comparisons between two groups of continuous data were performed using the Student's *t*-test (normal distribution) or the Mann-Whitney test (non-normal distribution). Comparisons between more than two groups of continuous data were performed by univariate ANOVA analysis with normal distributions or the Kruskal-Wallis ANOVA analysis in the case of variables with non-normal distributions. Patient data are presented as mean and standard deviation or median and IQR as appropriate. Leptin data present as median and IQR, while adiponectin data are shown as mean and standard deviation. Furthermore, the data were compared by means of a non-parametric Wilcoxon signed rank for two dependent variables. To assess relations between the studied variables, a correlation analysis was performed. The Spearman's rank order correlation test was used to test the correlations between the studied parameters. The ROC curves, area under a curve (AUC) and Youden's index were also used in the analysis. Optimal cut-off values were defined. Kaplan-Meier curves were used to express survival times and the long-rank test was used to compare survival times. The term "overall survival" (OS) describes the period of time between randomization or treatment beginning and death. Progression-free survival (PFS) refers to the time from randomization or initiation of treatment to the occurrence of disease progression or death. Leptin and adiponectin were also included in multiple linear regression models with adjustments for BMI, age, parity, menopausal status, smoking status, tumor stage, tumor diameter, histological type, intrinsic type and nodal involvement. The statistical significance was predetermined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Baseline Characteristics

Seventy women were selected who met the inclusion and exclusion criteria for the study. Table 1 present the baseline characteristic of study group. The median age was 54.5 years (IQR = 49.0–59.0), median BMI was 25.06 kg/m² (IQR = 22.6–28.8) and median tumour size was 1.5 cm (IQR = 1.1–2.1). Of the 70 women, 26 were premenopausal and 44 postmenopausal. In the TNM classification of breast cancer, there were 48 patients at stage T1 and 22 patients at T2. Analysing the histological type of breast cancer, 61 patients had invasive ductal carcinoma and nine had invasive lobular carcinoma. Only 17 of the 70 patients had metastases to local lymph nodes. Considering the molecular type of breast cancer, 50 patients had luminal A cancer, 16 had luminal B HER (negative) and four had luminal B HER (positive) cancer. Sixty-five patients were progesterone receptor and E-cadherin positive. The Ki-67 proliferation index was below 20% in 50 patients. Fifty-six patients underwent BCS and 14 had a mastectomy. The breast cancer of 43 patients did not require chemotherapy and 68 women received endocrine therapy. During the observation (the median follow-up was 68.5 months [IQR = 59–72 months]), 11 events occurred, one distant metastasis and ten deaths. The recurrence rate was 15.71%.

Table 1. Baseline and clinical characteristics of the study group.

| Demographic and Clinical Data | Number of Patients (%) |
|-----------------------------------|------------------------|
| Age | |
| <55 years | 35 (50%) |
| >55 years | 35 (50%) |
| Menopausal status | |
| pre-menopausal | 26 (37%) |
| post-menopausal | 44 (63%) |
| BMI (kg/m ²) | |
| Normal (18.5 ≤ 24.99) | 34 (48.6%) |
| Overweight (25 ≤ 29.99) | 23 (32.8%) |
| Obese (30 ≤ 39.99) | 13 (18.6%) |
| Parity status | |
| 0 | 6 (9%) |
| 1–2 | 50 (71%) |
| 3 and more | 14 (20%) |
| Localization of tumour | |
| Right breast | 36 (51%) |
| Left breast | 34 (49%) |
| Diameter of the tumour | |
| <2 cm | 48 (69%) |
| >2 cm <5 cm | 22 (31%) |
| Lymph node status | |
| N0 | 53 (76%) |
| N1 | 17 (24%) |
| Histological type | |
| IDC | 61 (87%) |
| ILC | 9 (13%) |
| TNM staging classification | |
| T1 | 48 (69%) |
| T2 | 22 (31%) |
| Grade according to Elston-Ellis | |
| 1 + 2 | 61 (87%) |
| 3 | 9 (13%) |
| Molecular type | |
| Luminal A (HR+/HER2−/Ki-67 < 20%) | 50 (71%) |
| Luminal B (HR+/HER2−/Ki-67 ≥ 20%) | 16 (23%) |
| Luminal B HER2+ (HR+ HER2+) | 4 (6%) |
| Staging | |
| I | 35 (50%) |
| II | 35 (50%) |
| Progesterone receptor (PR) | |
| Negative | 5 (7%) |
| Positive | 65 (93%) |
| E-cadherin | |
| Negative | 5 (7%) |
| Positive | 65 (93%) |
| Ki-67 | |
| <20% | 50 (71%) |
| ≥20 % | 20 (29%) |

BMI: body mass index; N0: no evidence of spread to lymph nodes; N1: spread to auxiliary lymph nodes; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma; T1: tumour is smaller than 2 cm across; T2: tumour is 2 to 5 cm across; HR+: hormone receptor positive; HER2−: human epidermal growth factor receptor 2 negative; HER2+: human epidermal growth factor receptor 2 positive; Ki67: marker of proliferation Ki-67.

3.2. Leptin Levels before and after Treatment with Respect to Clinical Parameters

Table 2 demonstrates the clinicopathological features with respect to pre- and post-treatment leptin concentrations. Generally, post-treatment leptin concentrations were higher independently of clinicopathological factors with respect to pre-treatment leptin levels. Significantly higher levels of pre-treatment leptin concentrations in overweight and obese patients ($p < 0.0001$) were noted. In addition, with respect to the histological types of tumour, pre- and post-treatment leptin concentrations showed a tendency to significance. Both pre- and post-treatment concentrations were higher for invasive ductal carcinoma ($p = 0.0595$ and $p = 0.0729$, respectively) than for invasive lobular carcinoma. Additionally, a significantly higher post-treatment leptin concentration was observed in E-cadherin positive tumours ($p = 0.0350$). Pre-treatment leptin concentrations were higher in E-cadherin positive breast cancers with a tendency to significance ($p = 0.0611$).

Table 2. Leptin concentrations with respect to clinicopathological features.

| Analyzed Parameters/ Number of Patients | Pre-Treatment Leptin Concentration (ng/mL) | Post-Treatment Leptin Concentration (ng/mL) | <i>p</i> -Value |
|--|---|--|-----------------|
| Age | $p = 0.1130$ | $p = 0.6956$ | |
| <55 years | 8.43 | 21.17 | 0.0003 |
| 35 | 4.00/16.92 | 13.02/34.39 | |
| ≥55 years | 12.55 | 25.07 | 0.0025 |
| 35 | 7.67/20.78 | 14.17/32.97 | |
| BMI (kg/m ²) | $p < 0.0001$ | $p = 0.2419$ | |
| Normal (18.5 ≤ 24.99) | 6.11 | 16.99 | 0.0001 |
| 34 | 3.12/9.70 | 9.56/32.97 | |
| Overweight (25 ≤ 29.99) | 14.79 | 24.23 | 0.0051 |
| 23 | 9.60/20.64 | 16.54/32.17 | |
| Obese (30 ≤ 39.99) | 25.26 | 26.88 | 0.3824 |
| 13 | 16.92/30.93 | 19.50/42.95 | |
| Menopausal status | $p = 0.2166$ | $p = 0.9416$ | |
| Premenopausal | 6.99 | 23.51 | 0.0019 |
| 26 | 3.87/18.60 | 14.06/37.45 | |
| Postmenopausal | 12.58 | 23.93 | 0.0005 |
| 44 | 6.73/19.40 | 12.94/32.61 | |
| Parity status | $p = 0.8361$ | $p = 0.1044$ | |
| 0 | 7.84 | 15.67 | 0.3454 |
| 6 | 5.57/14.41 | 9.56/19.23 | |
| 1–2 | 12.55 | 22.94 | 0.0011 |
| 50 | 5.69/19.31 | 12.41/32.17 | |
| 3 and more | 12.38 | 29.83 | 0.0015 |
| 14 | 4.92/16.92 | 21.37/39.42 | |
| Postmenopausal hormone therapy | $p = 0.6971$ | $p = 0.1947$ | |
| No | 12.45 | 25.36 | < 0.0001 |
| 59 | 5.13/19.31 | 13.62/38.30 | |
| Yes | 7.67 | 18.76 | 0.5754 |
| 11 | 5.26/15.68 | 13.23/21.87 | |
| Localization of the tumour | $p = 0.6974$ | $p = 0.6874$ | |
| Right breast | 12.04 | 25.06 | 0.0001 |
| 36 | 5.57/17.89 | 13.62/38.30 | |
| Left breast | 12.38 | 22.08 | 0.0086 |
| 34 | 5.26/19.21 | 13.56/32.79 | |
| Diameter of the tumour | $p = 0.3855$ | $p = 0.9187$ | |
| <2 cm | 9.60 | 24.50 | < 0.0001 |
| 48 | 4.60/19.40 | 14.34/32.79 | |
| ≥2 cm < 5 cm | 13.57 | 21.30 | 0.0186 |
| 22 | 7.79/17.89 | 10.08/36.60 | |
| Lymph node status | $p = 0.8458$ | $p = 0.1854$ | |
| N0 | 11.89 | 20.46 | 0.0007 |
| 53 | 5.34/19.21 | 12.94/32.17 | |
| N1 | 12.63 | 28.56 | 0.0005 |
| 17 | 4.60/16.92 | 18.86/45.77 | |

Table 2. Cont.

| Analyzed Parameters/ Number of Patients | Pre-Treatment Leptin Concentration (ng/mL) | Post-Treatment Leptin Concentration (ng/mL) | <i>p</i> -Value |
|--|---|--|-------------------|
| TNM staging classification | <i>p</i> = 0.3818 | <i>p</i> = 0.9133 | |
| T1 | 9.60 | 24.50 | |
| 48 | 4.60/19.40 | 14.34/32.79 | <0.0001 |
| T2 | 13.57 | 21.30 | |
| 22 | 7.79/17.89 | 10.08/36.60 | 0.0186 |
| Grade according to Elston-Ellis | <i>p</i> = 0.6495 | <i>p</i> = 0.1254 | |
| 1 + 2 | 12.38 | 20.46 | |
| 61 | 5.57/19.21 | 12.94/32.61 | <0.0001 |
| 3 | 10.07 | 31.25 | |
| 9 | 3.61/20.40 | 26.58/40.63 | 0.0281 |
| Histological type | <i>p</i> = 0.0595 | <i>p</i> = 0.0729 | |
| Invasive ductal carcinoma (IDC) | 12.61 | 24.77 | |
| 61 | 6.11/19.40 | 14.50/36.60 | <0.0001 |
| Invasive lobular carcinoma (ILC) | 5.57 | 10.08 | |
| 9 | 2.83/11.56 | 6.87/25.35 | 0.0858 |
| Molecular type | <i>p</i> = 0.9479 | <i>p</i> = 0.7267 | |
| Luminal A (HR+/HER2-/Ki-67 < 20%) | 12.55 | 23.93 | |
| 50 | 5.46/18.69 | 14.49/32.97 | 0.0001 |
| Luminal B (HR+/HER2-/Ki-67 ≥ 20%) | 9.70 | 21.73 | |
| 16 | 4.00/19.21 | 9.22/33.86 | 0.0409 |
| Luminal B HER2+ (HR+ HER2+) | 12.85 | 20.40 | |
| 4 | 4.75/20.40 | 7.31/35.67 | 0.0679 |
| Staging | <i>p</i> = 0.7299 | <i>p</i> = 0.3657 | |
| I | 9.19 | 20.46 | |
| 35 | 4.85/20.71 | 13.90/31.00 | 0.0055 |
| II | 12.63 | 25.54 | |
| 35 | 6.17/17.89 | 12.94/42.95 | 0.0001 |
| Progesterone receptor | <i>p</i> = 0.4381 | <i>p</i> = 0.1460 | |
| Negative | 9.50 | 43.02 | |
| 5 | 7.79/9.70 | 27.41/51.50 | 0.0431 |
| Positive | 12.55 | 22.79 | |
| 65 | 5.26/19.40 | 13.62/32.17 | <0.0001 |
| E-cadherin | <i>p</i> = 0.0611 | <i>p</i> = 0.0350 | |
| Negative | 3.12 | 8.74 | |
| 5 | 2.83/4.43 | 5.91/10.08 | 0.3452 |
| Positive | 12.55 | 24.77 | |
| 65 | 6.11/19.21 | 14.50/32.97 | <0.0001 |
| Ki-67 (%) | <i>p</i> = 0.4450 | <i>p</i> = 0.6204 | |
| <20 | 12.21 | 20.46 | |
| 50 | 4.92/17.89 | 13.62/32.61 | 0.0002 |
| ≥20 | 13.40 | 26.12 | |
| 20 | 6.17/23.88 | 14.48/38.01 | 0.0038 |

Data are expressed as median (Me) and inter-quartile range (IQR); *p*-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold. BMI: body mass index; N0: no evidence of spread to lymph nodes; N1: spread to axillary lymph nodes; T1: tumour is smaller than 2 cm across; T2: tumour is 2 to 5 cm across; HR+: hormone receptor positive; HER2-: human epidermal growth factor receptor 2 negative; HER2+: human epidermal growth factor receptor 2 positive; Ki67: marker of proliferation Ki-67.

Tables 3 and 4 present leptin concentrations with regard to the types of therapy. Regardless of the treatment pattern, leptin concentration increased after treatment application.

Table 3. Leptin concentrations according to the types of surgery and adjuvant therapy in IBrC subjects.

| Feature/ Number of Patients | Pre-Treatment Leptin Concentration (ng/mL) | Post-Treatment Leptin Concentration (ng/mL) | <i>p</i> -Value |
|-----------------------------------|---|--|-----------------|
| Surgery | <i>p</i> = 0.1058 | <i>p</i> = 0.9101 | |
| BCS + Radiotherapy – BCT | 9.55 | 23.09 | 0.0019 |
| 56 | 3.06/14.87 | 10.92/36.6 | |
| Mastectomy | 12.63 | 24.23 | 0.0002 |
| 14 | 6.11/20.64 | 14.17/32.61 | |
| Chemotherapy | <i>p</i> = 0.0967 | <i>p</i> = 0.6341 | |
| Anthracycline | 8.11 | 24.77 | 0.0006 |
| 23 | 3.56/15.90 | 9.69/38.30 | |
| Non-anthracycline | 14.43 | 31.25 | 0.1441 |
| 4 | 4.35/28.24 | 19.28/40.44 | |
| No | 13.53 | 22.79 | 0.0019 |
| 43 | 6.11/20.64 | 14.50/32.17 | |
| Endocrine therapy | <i>p</i> = 0.5685 | <i>p</i> = 0.2121 | |
| Tamoxifen | 13.08 | 19.52 | 0.0319 |
| 40 | 6.14/19.93 | 11.05/31.78 | |
| Inhibitor aromatase | 11.56 | 25.73 | 0.0012 |
| 17 | 4.92/17.89 | 14.49/41.43 | |
| Tamoxifen and inhibitor aromatase | 14.79 | 32.61 | 0.0180 |
| 7 | 4.60/23.60 | 22.79/49.50 | |
| Other type | 3.93 | 23.06 | 0.1797 |
| 4 | 2.59/5.26 | 13.73/30.34 | |
| No | 8.55 | 17.44 | 0.1797 |
| 2 | 2.68/14.41 | 15.65/19.23 | |

Data are expressed as median (Me) and inter-quartile range (IQR); *p*-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold. BCS: breast-conserving surgery; BCT: breast-conserving therapy.

Table 4. Leptin concentrations regarding types of therapy in IBrC patients.

| Feature/ Number of Patients | Pre-Treatment Leptin Concentration (ng/mL) | Post-Treatment Leptin Concentration (ng/mL) | <i>p</i> -Value |
|--|---|--|-----------------|
| Monotherapy | <i>p</i> = 0.0986 | <i>p</i> = 0.7621 | |
| 2 | 8.55 | 17.44 | 0.1797 |
| Combination therapies with chemotherapy | 2.68/14.41 | 15.65/19.23 | |
| 26 | 8.11 | 25.35 | 0.0002 |
| Combination therapies with hormone therapy | 3.72/16.92 | 9.69/38.30 | |
| 42 | 13.53 | 23.09 | 0.0030 |
| | 6.73/20.64 | 14.49/32.61 | |

Data are expressed as median (Me) and inter-quartile range (IQR); *p*-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold.

3.3. Clinical Presentation of Patients in Relation to Pre- and Post-Treatment Adiponectin Concentrations

The next step in the statistical analysis (Table 5) was to evaluate the clinical parameters in relation to pre- and post-treatment adiponectin concentrations. Generally, post-treatment adiponectin concentrations were higher independently of clinicopathological factors. Lower concentrations were noted in overweight and obese patients than in patients with normal BMI in relation to pre- and post-treatment adiponectin concentrations (*p* = 0.009 and *p* = 0.0002, respectively). Higher pre-treatment adiponectin levels were observed in patients without children or with 1–2 children than in women who had given birth three or more times (*p* = 0.0385). In addition, higher post-treatment adiponectin concentrations were noted in patients with a negative E-cadherin tumour (*p* = 0.0202). A similar increasing effect of pre-treatment adiponectin concentration was observed with a tendency to significance (*p* = 0.0775).

Table 5. Adiponectin concentrations with respect to clinicopathological features.

| Analyzed Parameters/ Number of Patients | Pre-Treatment Adiponectin Concentration (ng/mL) | Post-Treatment Adiponectin Concentration (ng/mL) | <i>p</i> -Value |
|--|--|--|-----------------|
| Age | <i>p</i> = 0.5368 | <i>p</i> = 0.7667 | |
| <55 years | 26.25 | 31.88 | 0.0087 |
| 35 | (7.22) | (10.07) | |
| ≥55 years | 27.41 | 31.06 | 0.0358 |
| 35 | (8.05) | (11.89) | |
| BMI (kg/m ²) | <i>p</i> = 0.031 | <i>p</i> = 0.0009 | |
| Normal (18.5 ≤ 24.99) | 29.26 | 36.72 | 0.0012 |
| 34 | (6.41) | (9.63) | |
| Overweight (25 ≤ 29.99) | 24.91 | 27.82 | 0.2736 |
| 23 | (8.32) | (8.85) | |
| Obese (30 ≤ 39.99) | 23.79 | 25.74 | 0.3109 |
| 13 | (7.82) | (12.40) | |
| Menopausal status | <i>p</i> = 0.4512 | <i>p</i> = 0.1788 | |
| Premenopausal | 25.89 | 33.87 | 0.0015 |
| 26 | (7.56) | (10.37) | |
| Postmenopausal | 27.37 | 30.08 | 0.0908 |
| 44 | (7.69) | (11.18) | |
| Parity status | <i>p</i> = 0.0385 | <i>p</i> = 0.4023 | |
| 0 | 28.84 | 36.79 | 0.0277 |
| 6 | (6.62) | (7.97) | |
| 1–2 | 28.12 | 31.35 | 0.0447 |
| 50 | (7.34) | (11.24) | |
| 3 and more | 22.1 | 29.53 | 0.033 |
| 14 | (7.67) | (11.08) | |
| Postmenopausal hormone therapy | <i>p</i> = 0.3383 | <i>p</i> = 0.2784 | |
| No | 26.44 | 32.01 | 0.0005 |
| 59 | (7.68) | (10.30) | |
| Yes | 28.86 | 27.49 | 0.5754 |
| 11 | (7.28) | (15.22) | |
| Localization of the tumour | <i>p</i> = 0.8924 | <i>p</i> = 0.4601 | |
| Right breast | 26.71 | 32.43 | 0.0071 |
| 36 | (7.31) | (11.19) | |
| Left breast | 26.97 | 30.42 | 0.0378 |
| 34 | (8.02) | (10.80) | |
| Diameter of the tumour | <i>p</i> = 0.2570 | <i>p</i> = 0.8556 | |
| < 2 cm | 27.58 | 31.63 | 0.0330 |
| 48 | (7.65) | (11.73) | |
| ≥2 cm < 5 cm | 25.32 | 31.11 | 0.0033 |
| 22 | (7.49) | (9.50) | |
| Lymph node status | <i>p</i> = 0.2285 | <i>p</i> = 0.4353 | |
| N0 | 26.18 | 30.86 | 0.0057 |
| 53 | (7.91) | (10.99) | |
| N1 | 28.77 | 33.34 | 0.0494 |
| 17 | (6.49) | (11.04) | |
| TNM staging classification | <i>p</i> = 0.2570 | <i>p</i> = 0.8556 | |
| T1 | 27.58 | 31.63 | 0.0330 |
| 48 | (7.65) | (11.73) | |
| T2 | 25.32 | 31.11 | 0.0033 |
| 22 | (7.49) | (9.50) | |

Table 5. Cont.

| Analyzed Parameters/ Number of Patients | Pre-Treatment Adiponectin Concentration (ng/mL) | Post-Treatment Adiponectin Concentration (ng/mL) | p-Value |
|--|---|--|---|
| Grade according to Elston-Ellis 1 + 2 61 3 9 | $p = 0.7517$ 26.95 (7.56) 26.03 (8.53) | $p = 0.5338$ 31.14 (11.03) 33.74 (10.92) | 0.0056 0.0180 |
| Histological type Invasive ductal carcinoma (IDC) 61 Invasive lobular carcinoma (ILC) 9 | $p = 0.1051$ 26.24 (7.77) 30.67 (5.40) | $p = 0.0839$ 30.53 (11.17) 37.33 (7.66) | 0.0047 0.0506 |
| Molecular type Luminal A (HR+/HER2-/Ki-67 < 20%) 50 Luminal B (HR+/HER2-/Ki-67 ≥ 20%) 16 Luminal B HER2+ (HR+ HER2+) 4 | $p = 0.1418$ 27.91 (7.60) 24.78 (7.01) 21.66 (8.16) | $p = 0.5357$ 30.89 (11.86) 33.91 (8.40) 28.22 (9.57) | 0.1234 0.0018 0.0679 |
| Staging I 35 II 35 | $p = 0.9218$ 26.93 (8.09) 26.75 (7.27) | $p = 0.7694$ 31.05 (11.99) 31.85 (10.07) | 0.098 0.0015 |
| Progesterone receptor Negative 5 Positive 65 | $p = 0.8164$ 27.61 (3.00) 26.77 (7.88) | $p = 0.7871$ 30.17 (4.80) 31.56 (11.34) | 0.3452 0.0012 |
| E-cadherin Negative 5 Positive 65 | $p = 0.0775$ 32.62 (7.66) 26.37 (7.66) | $p = 0.0202$ 42.3 (6.80) 30.57 (10.8) | 0.0431 0.0042 |
| Ki-67 (%) <20 50 ≥20 20 | $p = 0.1076$ 27.75 (7.40) 24.36 (7.85) | $p = 0.4026$ 30.71 (11.30) 33.19 (10.21) | 0.0564 0.0038 |

Data are expressed as means ± standard deviation; p -values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold. BMI: body mass index; N0: no evidence of spread to lymph nodes; N1: spread to axillary lymph nodes; T1: tumour is smaller than 2 cm across; T2: tumour is 2 to 5 cm across; HR+: hormone receptor positive; HER2-: human epidermal growth factor receptor 2 negative; HER2+: human epidermal growth factor receptor 2 positive; Ki67: marker of proliferation Ki-67.

Additional analysis was performed to evaluate the adiponectin concentrations with regard to the types of therapy (Tables S1 and S2). Breast-conserving therapy was associated with increased adiponectin level ($p = 0.0043$), similar results were obtained with respect to chemotherapy based on anthracycline ($p = 0.0043$). Tamoxifen demonstrates similar effect on adiponectin level ($p = 0.0076$). Application of combine therapy with chemotherapy was associated with elevation of adiponectin concentration ($p = 0.0019$).

3.4. Relationships between Clinicopathological Features and between Adipokines Concentrations

Figure 2 presents the correlation analysis which was performed to find relationships between pre-treatment adipokines and the clinical variables. The analysis was carried out

using the Spearman's rank correlation and is presented in the form of a heatmap. As a result, the pre-treatment leptin concentration was found to correlate positively with age and BMI ($r = 0.2422$, $r = 0.7718$, respectively). The pre-treatment adiponectin concentration correlates negatively with BMI ($r = -0.3281$).

| | Pre-Treatment Leptin Concentration ng/mL | Pre-Treatment Adiponectin Concentration ng/mL |
|--|--|---|
| Age | 0.2422 | 0.1781 |
| BMI kg/m ² | 0.7718 | -0.3281 |
| Menopausal status | 0.1529 | 0.1321 |
| Diameter of the tumor Cm | -0.0733 | 0.0274 |
| Localization of the tumor | 0.0486 | 0.0602 |
| Grade according to Elston-Ellis | -0.0559 | -0.0286 |
| Lymph node status | -0.0248 | 0.1242 |
| Progesterone receptor | 0.0969 | -0.0147 |
| E-cadherin | 0.2321 | -0.2379 |
| Ki-67 % | -0.0266 | -0.1377 |
| Tumor stage | 0.0051 | -0.0063 |
| Histological type | -0.2331 | 0.2195 |
| Molecular type | -0.0401 | -0.2219 |



Figure 2. Heatmap displaying the r values obtained from Spearman correlation analysis performed among clinicopathological features; p -values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold. BMI: Body Mass Index; Ki67: marker of proliferation Ki-67.

Figure 3 presents the correlations between the investigated adipokine concentrations. The analysis was carried out using the Spearman's rank correlation and is presented in the form of a heatmap. The pre-treatment leptin concentration correlates positively with the post-treatment leptin concentration ($r = 0.2808$) and negatively with the post-treatment adiponectin concentration ($r = -0.3934$). The pre-treatment adiponectin concentration correlates positively with the post-treatment adiponectin concentration ($r = 0.4097$).

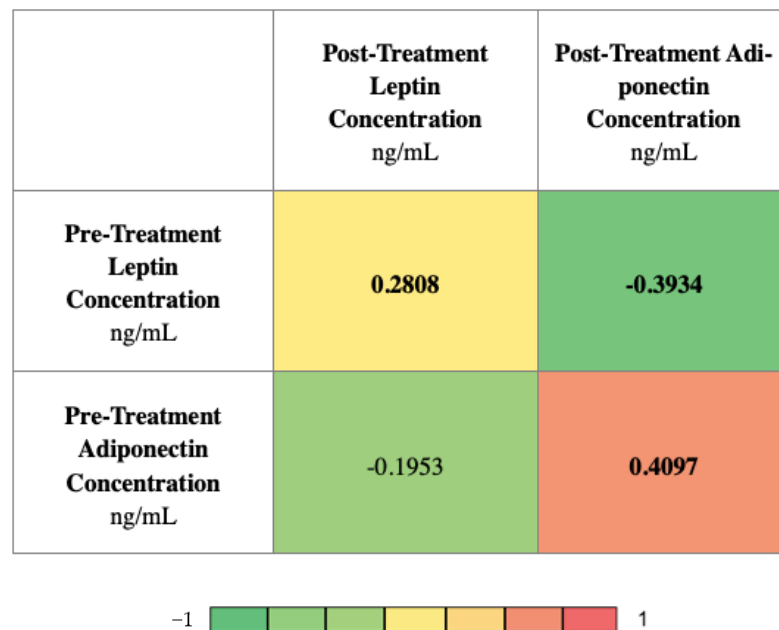


Figure 3. Heatmap displaying the r values obtained from Spearman correlation analysis performed among investigated adipokines concentrations; *p*-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold.

3.5. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis of Adipokines before Treatment

The ROC curve was created to evaluate the predictive value of the studied adipokines concentrations (before treatment) to predict the OS and PFS (Figure 4). The areas under the curve with 95% confidence interval were established (AUC, 95% thresholds with sensitivity and specificity). For this analysis, the parameters showed no prognostic value in our cohort (Table 6).

Table 6. Results of predictive accuracy for pre-treatment adipokines.

| ROC Data | Destimulant | Destimulant |
|-------------------------------|---|--|
| | Pre-Treatment Leptin Concentration ng/mL | Pre-Treatment Adiponectin Concentration ng/mL |
| AUC | 0.599 | 0.573 |
| Youden index | 0.34 | 0.21 |
| Cut-off point | 16.92 | 28.49 |
| Sensitivity (%) | 100.0 | 77.8 |
| Specificity (%) | 34.5 | 43.1 |
| Positive predictive value (%) | 19.1 | 17.5 |
| Negative predictive value (%) | 100.0 | 92.6 |
| Accuracy (%) | 43.3 | 47.8 |
| <i>p</i> -value | 0.2497 | 0.5007 |

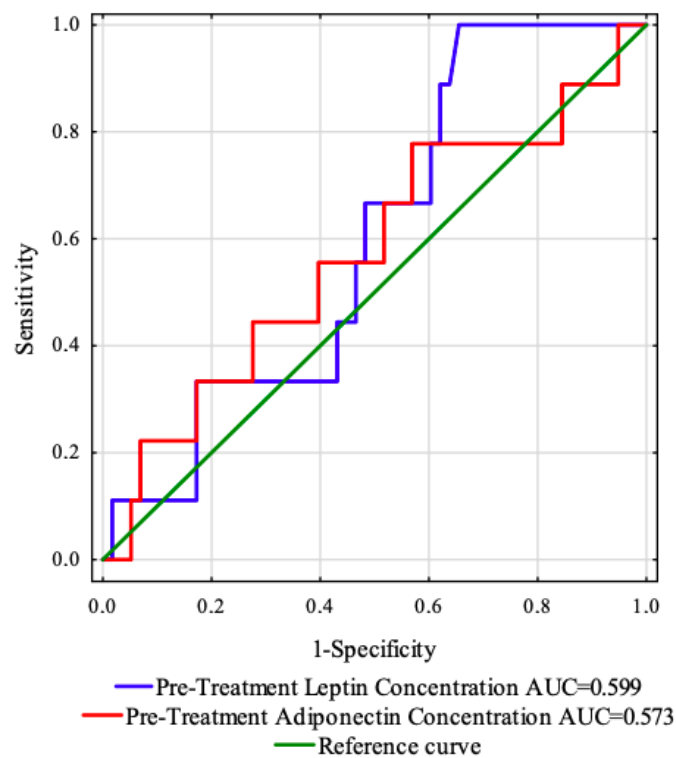


Figure 4. ROC curves and AUC values of the investigated adipokines before treatment.

3.6. Survival Analysis Regarding Pre-Treatment Adipokines

The next step in the statistical analysis was to use the cut-off points from the ROC curve for leptin and adiponectin before treatment and to calculate the cut-off point based on the median for these adipokines (Table 7). The patients were then divided into two groups: below and above the cut-off point. The OS and PFS were assessed for each group. The median follow-up was 68.5 months (IQR = 59–72 months). During the observation, ten patients died due to systemic metastatic disease and only one case had a recurrence. The recurrence rate was 15.71%.

Table 7. The median and ROC cut-off point values of the studied parameters before treatment were calculated.

| | Pre-Treatment Leptin Concentration ng/mL | Pre-Treatment Adiponectin Concentration ng/mL |
|--------------------|---|--|
| Medians | 12.38 | 27.2 |
| ROC cut-off points | 16.92 | 28.49 |

For this analysis, the parameters showed no predictive value in our cohort (Figures 5A–D and 6A–D).

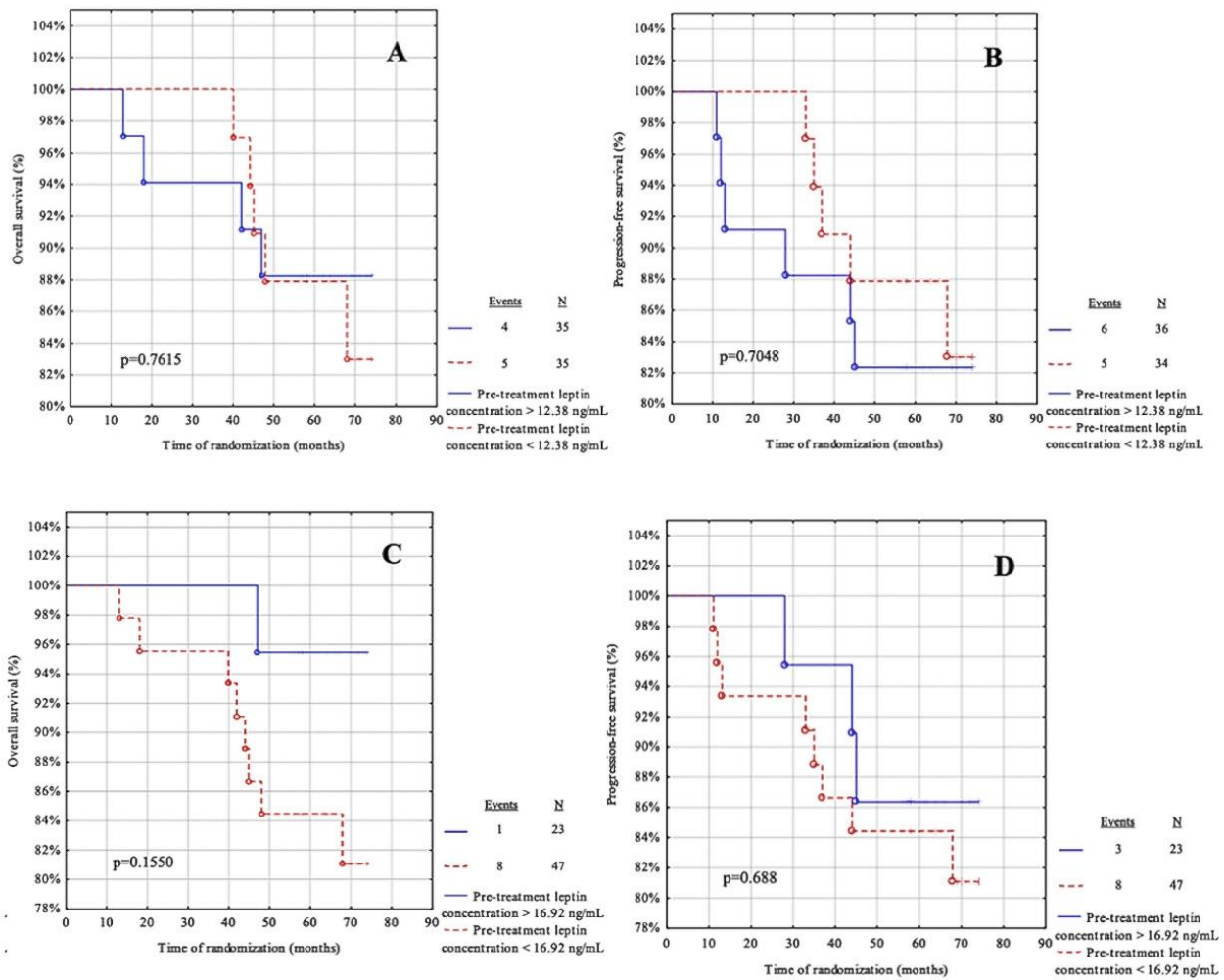


Figure 5. Kaplan-Meier curves for the overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) analysis regarding (A,B) pre-treatment leptin concentration according to median value cut-off; (C,D) pre-treatment leptin concentration according to ROC cut-off. Significant differences are denoted by bold *p*-values.

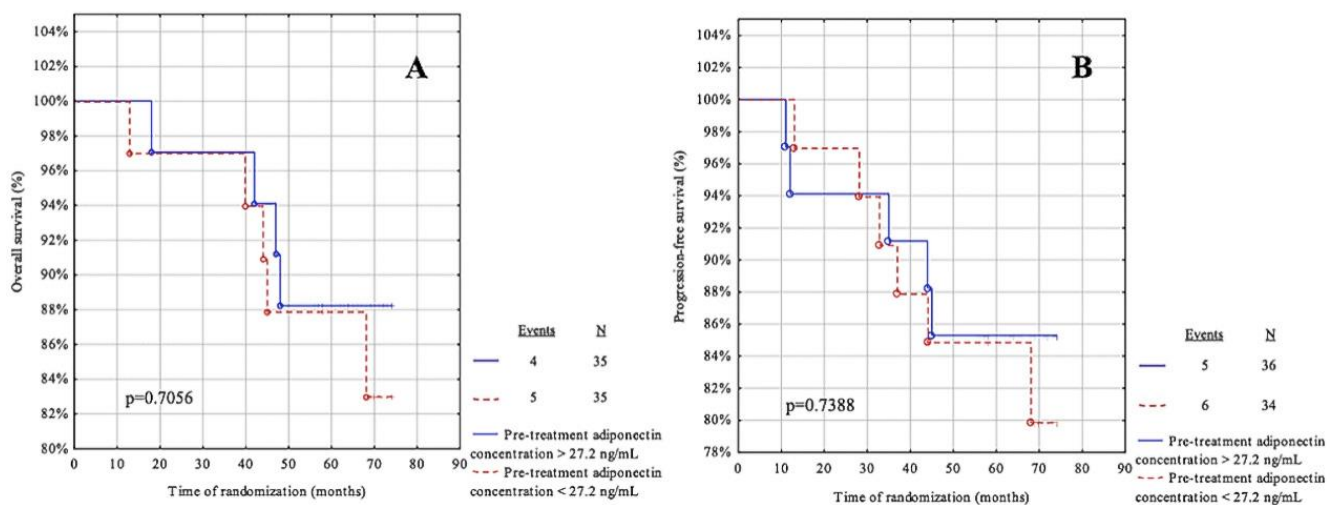


Figure 6. Cont.

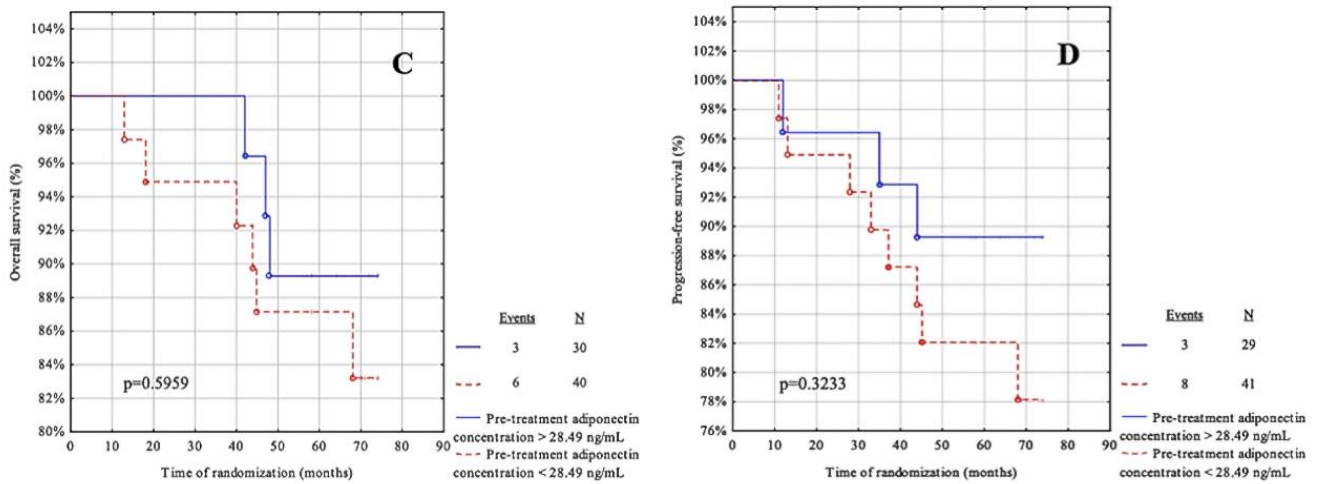


Figure 6. Kaplan-Meier curves for the overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) analysis regarding (A,B) pre-treatment adiponectin concentration according to median value cut-off; (C,D) pre-treatment adiponectin concentration according to ROC cut-off. Significant differences are marked with a bold *p*-values.

3.7. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis of Adipokines after Treatment

Figure 7 shows the ROC curve determined to estimate the prognostic value of the concentrations of the examined adipokines (after treatment) for predicting the OS and PFS. The areas under the curve with 95% confidence intervals (AUC, 95% thresholds with sensitivity and specificity) were established.

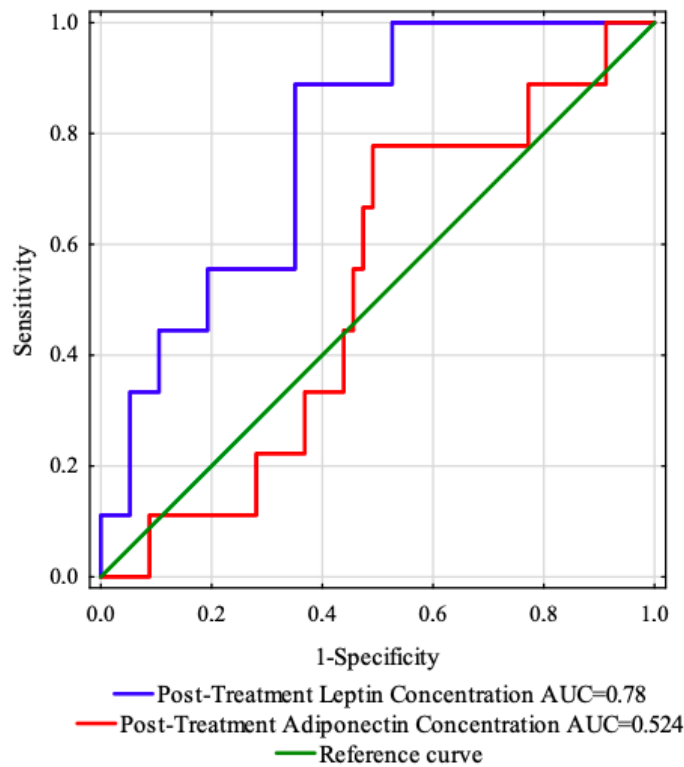


Figure 7. ROC curves and AUC values of the investigated adipokines after treatment.

Following the results of the study, the post-treatment leptin concentration was found to be the strongest predictor of disease relapse (AUC = 0.78, *p* < 0.0001). Using the maximum value of the Youden index, a post-treatment leptin concentration of 26.88 ng/mL with

sensitivity of 88.9% and specificity of 64.9% was identified as the best cut-off value to distinguish patients with or without disease recurrence (Table 8).

Table 8. Results of predictive accuracy for post-treatment adipokines.

| ROC Data | Stimulant | Destimulant |
|-------------------------------|--|---|
| | Post-Treatment Leptin Concentration ng/mL | Post-Treatment Adiponectin Concentration ng/mL |
| AUC | 0.78 | 0.524 |
| Youden index | 0.54 | 0.29 |
| Cut-off point | 26.88 | 32.88 |
| Sensitivity (%) | 88.9 | 77.8 |
| Specificity (%) | 64.9 | 50.9 |
| Positive predictive value (%) | 28.6 | 20.0 |
| Negative predictive value (%) | 97.4 | 93.5 |
| Accuracy (%) | 68.2 | 54.5 |
| <i>p</i> -value | <0.0001 | 0.7886 |

Significant differences are denoted by bold *p*-values.

3.8. Survival Analysis Regarding Post-Treatment Adipokines

Following this, the cut-off points from the ROC curve were used, and the cut-off points were calculated based on the median for these adipokines (Table 9). Patients were divided into two groups: below and above the cut-off point. The OS and PFS were assessed for each group. The median follow-up was 68.5 months (IQR = 59–72 months). During follow-up, ten patients died due to systemic metastases and only one patient had a relapse. The recurrence rate was 15.71%.

Table 9. The median and ROC cut-off point values of the studied parameters after treatment were calculated.

| | Post-Treatment Leptin Concentration ng/mL | Post-Treatment Adiponectin Concentration ng/mL |
|--------------------|--|---|
| Medians | 23.66 | 32.37 |
| ROC cut-off points | 26.88 | 32.88 |

Patients with post-treatment leptin concentrations below 23.66 ng/mL had a significantly better OS than those with post-treatment leptin concentrations above 23.66 ng/mL ($p = 0.0128$) (Figure 8A). Thirty-five patients had concentrations below 23.66 ng/mL and 35 had concentrations above 23.66 ng/mL. There was one (2.86%) event in the group of women with concentrations below 23.66 ng/mL and eight (22.86%) relapses in the group with concentrations above 23.66 ng/mL. Similar results were obtained for the post-treatment leptin concentrations (Figure 8C) with the cut-off point determined from the ROC curve ($p = 0.0027$).

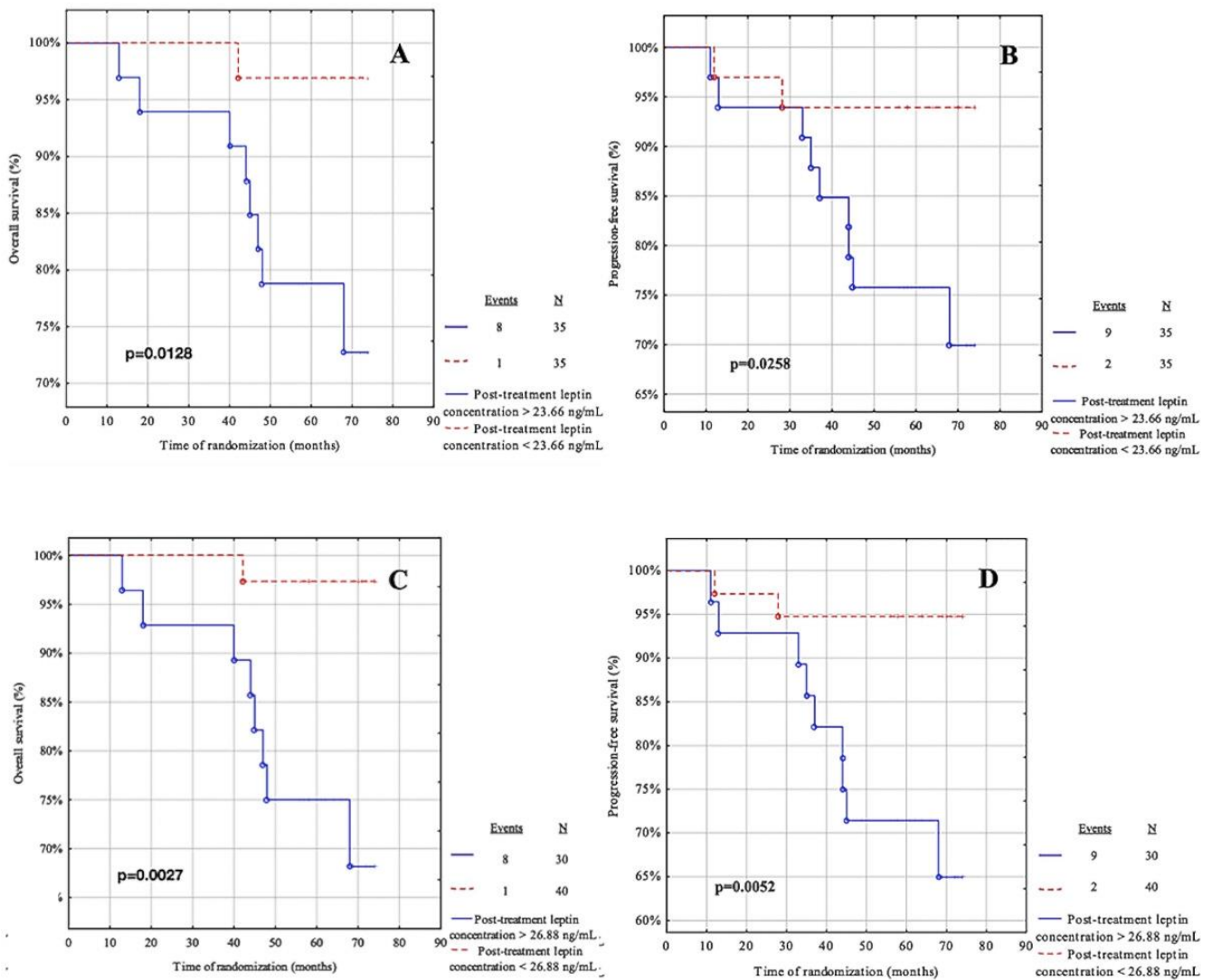


Figure 8. Kaplan-Meier curves for the overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) analysis regarding (A,B) post-treatment leptin concentration according to median value cut-off; (C,D) post-treatment leptin concentration according to ROC cut-off. Significant differences are marked with a bold *p*-values.

Subjects with post-treatment leptin levels below 23.66 ng/mL had a significantly better PFS than patients with post-treatment leptin levels above 23.66 ng/mL ($p = 0.0128$) (Figure 8B). Thirty-five patients had concentrations below 23.66 ng/mL and 35 had concentrations above 23.66 ng/mL. There were two (5.71%) occurrences in the group of women with concentrations below 23.66 ng/mL and nine (25.71%) relapses in the group with concentrations above 23.66 ng/mL. Similar outcomes were obtained for the post-treatment leptin concentrations (Figure 8D) with the cut-off point determined from the ROC curve ($p = 0.0052$).

Figure 9A,B present the post-treatment adiponectin concentrations according to the median cut-off, while Figure 9C,D present the concentrations according to the cut-off from the ROC curve. For this analysis of the post-treatment adiponectin, these parameters showed no predictive value in our cohort.

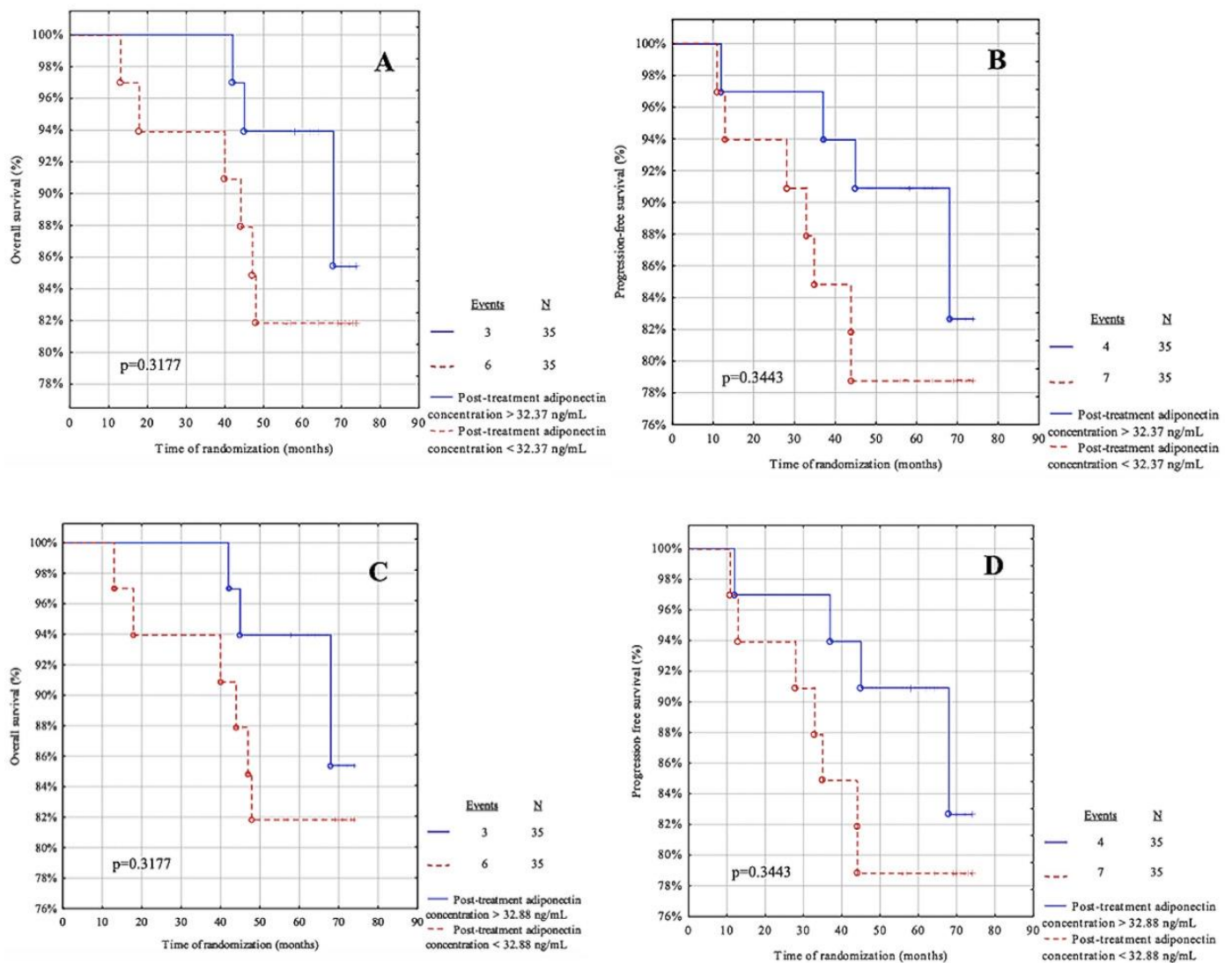


Figure 9. Kaplan-Meier curves for the overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) analysis regarding (A,B) post-treatment adiponectin concentration according to median value cut-off; (C,D) post-treatment adiponectin concentration according to ROC cut-off. Significant differences are marked with a bold *p*-values.

3.9. Association of Adipokines with Disease-Free Survival in Linear Regression

The last step in the statistical analysis (Table 10) was to determine linear regression models between pre- and post-treatment adipokines and disease-free survival. Breast cancer recurrence was negatively associated only with post-treatment leptin concentration. Model 1, 2 and 3 independently of adjusted factors showed that the higher post-treatment leptin concentration was correlated with a shorter disease-free survival ($p = 0.0078$; $p = 0.0031$, $p = 0.0324$, respectively). Adjusting for age, BMI, parity, menopausal status, smoking status, tumour stage, tumour diameters, intrinsic type, histological type and nodal involvement, Model 4 had a tendency to significance ($p = 0.0502$) in similar manner.

Table 10. Linear regression models for disease-free survival predictors in breast cancer patients.

| | | Model 1 | Model 2 | Model 3 | Model 4 |
|--|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| Pre-Treatment Leptin Concentration | Beta | 0.0665 | 0.0247 | −0.2997 | −0.0793 |
| | <i>p</i> -value | 0.6010 | 0.8991 | 0.8782 | 0.6486 |
| Post-Treatment Leptin Concentration | Beta | −0.3274 | −0.3895 | −0.2979 | −0.2413 |
| | <i>p</i> -value | 0.0078 | 0.0031 | 0.0324 | 0.0502 |
| Pre-Treatment Adiponectin Concentration | Beta | 0.1195 | 0.1743 | 0.2153 | 0.1372 |
| | <i>p</i> -value | 0.3390 | 0.2074 | 0.1211 | 0.2807 |
| Post-Treatment Adiponectin Concentration | Beta | 0.008 | 0.076 | 0.0109 | 0.0892 |
| | <i>p</i> -value | 0.9496 | 0.5946 | 0.9404 | 0.4901 |

Model 1 adjusted for age. Model 2 adjusted for age, BMI, parity, menopausal status. Model 3 adjusted for age, BMI, parity, menopausal status and smoking status. Model 4 adjusted for age, BMI, parity, menopausal status, smoking status, tumor stage, tumor diameters, intrinsic type, histological type, nodal involvement. Significant differences are marked with a bold *p*-values.

4. Discussion

Breast cancer is the most common malignancy in women worldwide. Its origin is based on processes of proliferation, evasion of growth suppressors, abnormalities in cell death, initiation of invasion and metastasis, disruption of cellular homeostasis and evasion of immune destruction with the additional important possibility of recurrence [13]. One of the risk factors for developing breast cancer, confirmed in many studies, is obesity. As an endocrine organ, adipose tissue produces a large range of factors that can influence the development of breast cancer. Leptin and adiponectin are the two main hormones secreted by adipocytes. The pro-cancerogenic effects of leptin and, conversely, the anti-cancerogenic effects of adiponectin are due to the modulation of the signalling pathways involved in proliferation and the subtle regulation of the apoptotic response [18].

4.1. Pre- and Post-Treatment Leptin and Adiponectin Values in Relation to Demographic, Anthropometric and Clinicopathological Characteristics

In the first stage of our study, we presented clinicopathological features with respect to pre- and post-treatment leptin concentrations. We observed significantly higher pre-treatment leptin concentrations in overweight and obese patients. These results are confirmed by the Spearman's correlation in which pre-treatment leptin concentration correlates positively with BMI. Bhat et al. revealed results that appear consistent with ours. They showed that leptin concentrations were higher in obese individuals and had a direct correlation with the degree of obesity [19]. Interestingly, in their study, Pan et al. divided patients by BMI level and found that serum leptin levels were not associated with breast cancer in healthy normal-weight individuals or normal-weight individuals with breast cancer. They noted a strong association between breast cancer risk and higher leptin levels in overweight or obese patients [20]. Furthermore, in our research we observed a tendency to significantly higher pre- and post-treatment leptin concentrations in invasive ductal carcinoma. Our results seem to support those of Karacay et al. who observed a higher rate of leptin receptor in invasive ductal carcinoma. According to them, leptin may have an autocrine promoting effect on breast cancer carcinogenesis and its inhibition may be effective in the treatment of breast cancer [21]. The study by Révillion et al. supports the conclusions formulated by Karacay et al. regarding the autocrine action of leptin on breast cancer cells. They showed that practically all breast cancer samples studied co-expressed the two main leptin receptor isoforms; long form leptin receptor (OBR-L) and short form leptin receptor (OBR-S). However, Révillion et al. showed increased leptin expression in patients with lobular carcinoma compared to other tumour types. [22]. Interestingly, in our study, we showed that E-cadherin positive tumours are characterised by elevated leptin concentrations after treatment. The pre-treatment leptin concentrations were close to being statistically significant. These results confirm the researchers' findings. Mauro et al. investigated the mechanism of tumour growth and showed that leptin increased E-cadherin-dependent

cell-cell adhesion. This implies that leptin is able to promote tumour cell proliferation and adhesion by increasing E-cadherin expression. This may indicate an important role for leptin in stimulating the growth and progression of primary breast tumour cells, especially in obese women [23]. In the next stage of the research, we compared leptin concentrations before and after treatment according to the types of applied treatment. Higher pre-treatment leptin levels were observed with a trend towards significance in patients treated with non-anthracycline chemotherapy or no chemotherapy. In addition, higher pre-treatment leptin levels were reported with a trend towards significance in patients whose doctor used combination therapy with hormone therapy. Interestingly, some studies indicate that leptin appears to stimulate ligand-independent oestrogen-receptor activation via the up-regulation mediator subunit 1 (Med1). It has been shown that Med1 may contribute to tamoxifen resistance in breast cancer cells, and high Med1 expression correlates with poor prognosis in patients treated with tamoxifen [24,25]. In the following stage of the study, the Spearman's correlation analysis showed that leptin before treatment correlates positively with age. We speculate that this may be due to a decrease in muscle mass versus an increase in body fat and a change in plasma concentrations of many hormones with age. However, the researchers' studies do not confirm our results. In their study, Isidori et al. showed an inverse relationship between age and leptin concentration [26].

In the current study, adiponectin concentrations (before and after treatment) were compared in relation to clinical parameters. In our research we observed lower concentrations of pre- and post-treatment adiponectin levels in obese women. These results are confirmed by Spearman's correlation in which the pre-treatment adiponectin concentration correlates negatively with BMI. Our results seem to support those of Matsubara et al. who observed decreased adiponectin concentrations in women with the highest BMI tertile compared with those in the middle and lowest BMI tertiles [27]. Furthermore, in our study, we observed higher pre-treatment adiponectin concentrations in non-pregnant women or those who had given birth to 1–2 children. Due to the fact that adiponectin is an adipokine with anti-inflammatory and anti-cancerogenic effects, we can speculate that this may have a protective effect. The present study also showed that in patients with E-cadherin negative tumours, we observed higher post-treatment adiponectin levels. Furthermore, a similar effect was demonstrated with a tendency to significance in pre-treatment adiponectin concentrations.

4.2. Post-Treatment Leptin Concentration as a Predictor of Relapse

The ROC curve and AUC value revealed that post-treatment leptin concentration is the best predictor of disease relapse. (AUC = 0.78, $p < 0.0001$). According on the Youden index, we indicated that the cut-off point of 26.88 ng/mL for the leptin concentration after treatment may serve as a value that distinguishes patients with or without disease recurrence, with a sensitivity of 88.9% and specificity of 64.9%. Furthermore, according to the Kaplan-Meier curves, we suggest that a post-treatment leptin concentration below 23.66 ng/mL has better OS and PFS. There was one event in the group of women with concentrations below 23.66 ng/mL and eight relapses in the group with concentrations above 23.66 ng/mL considering the OS analysis. Taking into account the PFS, there were two events in the group of women with concentrations below 23.66 ng/mL and nine recurrences in the group with concentrations above 23.66 ng/mL. Similar results were obtained for the post-treatment leptin concentrations with the ROC cut-off point. The recurrence rate was 15.71%. Using the linear regression models, it was ultimately found that regardless of the model used, excluding tumour-dependent factors and baseline factors (such as age, BMI, parity, menopausal status, smoking status, tumour stage, tumour diameters, intrinsic type, histological type, nodal involvement), higher post-treatment leptin concentration is correlated with shorter disease-free survival. Our results seem to support those of Cho et al. who observed a positive association between leptin and breast cancer recurrence, but only in patients with hormone receptor-positive tumours. Leptin, whose expression is elevated in overweight/obese individuals, promotes the production of oestrogen as a

result of increased aromatase activity which may be related to the progression of oestrogen receptor-positive cancers [28]. On the contrary, Obi et al. did not find supporting evidence for an association between leptin levels and overall mortality [29]. We want to make reference to the findings of an earlier study. [13]. Bielawski et al. noted increased recurrence rates and cancer-specific mortality in cases with a normal BMI and the highest concentration of leptin. Furthermore, the pre-treatment leptin concentration showed no predictive value as a single biomarker. Comparing our current results with those of the previous study, it seems appropriate to analyse leptin concentrations before and after treatment and to carry out longer follow-ups. Elevated leptin levels after treatment and consequently increased recurrence and mortality rates in breast cancer patients may be due to resistance to chemotherapy. One mechanism responsible for this is the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) signalling which controls the DNA transcription of several genes. Leptin stimulates NFκB, which may improve the survival of chemotherapy-treated cancer cells [30]. Another mechanism is hypoxia inducible factor (HIF), which correlates with the activation of leptin signalling in many malignancies, including endometrial, pancreatic, breast and colon cancers. Hypoxia in cancer is associated with poor outcomes and chemoresistance [31,32]. Letrozole resistance in IBrC has been shown by Pang et al. to be conferred by the leptin/PBX3/FGFR1 cascade. In a signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) -dependent mechanism, hyperleptinemia increases pre-B-cell leukaemia homeobox transcription factor 3 (PBX3) expression. By bringing the metastasis-associated 1-histone deacetylase 2 (MTA1-HDAC2) complex straight to the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) promoter, PBX3 increases the trans-activation of FGFR1. In the end, the resulting FGFR1 amplification impairs the therapy response to letrozole [33]. Gu et al. investigated the potential mechanisms by which high leptin expression reduces the sensitivity of ovarian cancer cells to treatment. Ovarian cancer patients were treated with paclitaxel (PTX) chemotherapy and the leptin mRNA expression data were analysed. They showed that the highest scoring was the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene set. EMT is the biological process by which polarised epithelial cells transform into mesenchymal cells. This process is not only common in tumour-initiating cells (increasing their invasive and migratory capacity), but is also closely associated with multiple drug resistance in human tumours [34].

4.3. Strengths and Limitation of the Study

The main limitations of the study were the small sample size and the fact that we recruited patients from only one study centre, which in itself limits the number of patients. Getting patients' permission to participate and having them meet very tight inclusion criteria determined the sample size. In addition, we recruited patients of Polish origin only, so our results may not be applicable to other ethnic groups. We recruited patients at an early stage of breast cancer without metastases, so we cannot determine what the prognostic value would be for larger and more advanced tumours. The strength of this study is that it was based on a six-year follow-up of patients with complete clinicopathological characteristics. All blood samples were taken prospectively from fasting patients one day prior to surgery, reducing any variations that would have happened if the samples had been taken at various times.

5. Conclusions

Despite the limited series of luminal IBrC patients included to the study, our results suggest a few important points: (1) Adjuvant IBrC therapy most likely increased the leptin and adiponectin levels, regardless of treatment patterns; (2) It seems that only post-treatment leptin concentration was associated with the future outcomes of luminal IBrC patients, since a concentration of leptin higher than 26.88 ng/mL has been shown to promote the probability of recurrence and morbi-mortality in the IBrC cohort; (3) Pre-treatment leptin levels correlated positively with leptin concentrations and negatively with adiponectin levels after adjuvant IBrC therapy, thus the pre-operative adipokines profile

may reflect its future associations; (4) Regardless of the linear regression model used, only post-treatment leptin levels showed prognostic implications; (5) Further study is necessary to determine whether chemotherapy resistance is the cause of elevated post-treatment leptin levels, increased rates of recurrence and mortality in patients with breast cancer.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/life12122063/s1>, Table S1. Adiponectin concentrations according to the types of surgery and adjuvant therapy in IBrC subjects. Table S2. Adiponectin concentrations regarding types of therapy in IBrC patients.

Author Contributions: Conceptualization, B.R.-C., K.K.; methodology, B.R.-C., K.K.; soft-ware, K.K.; validation, K.K., B.R.-C., K.W.; formal analysis, K.K.; investigation, K.K., B.R.-C.; resources, B.R.-C., P.R.; data curation, B.R.-C., P.R.; writing—original draft, K.K., B.R.-C.; writing—review & editing, B.R.-C.; visualization, K.K., K.W.; supervision, B.R.-C.; project administration, B.R.-C., P.R.; funding acquisition, B.R.-C., P.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

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.

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. Breast Cancer Awareness Month 2021, WHO. Available online: <https://www.iarc.who.int/featured-news/breast-cancer-awareness-month-2021/> (accessed on 1 August 2022).
2. American Cancer Society, Breast Cancer Facts & Figures 2019–2020. Available online: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2019-2020.pdf> (accessed on 12 August 2022).
3. Horvath, E. Molecular subtypes of breast cancer—What breast imaging radiologists need to know. *Rev. Chil. Radiol.* **2021**, *27*, 17–26.
4. Lombardi, A.; Lazzaron, I.R.; Bersigotti, L.; Vitale, V.; Amanti, C. The Proper Ki-67 Cut-Off in Hormone Responsive Breast Cancer: A Monoinstitutional Analysis with Long-Term Follow-Up. *Breast Cancer Targets Ther.* **2021**, *13*, 213–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Holm, J.B.; Rosendahl, A.H.; Borgquist, S. Local Biomarkers Involved in the Interplay between Obesity and Breast Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 6286. [[CrossRef](#)]
6. Mancuso, P. The role of adipokines in chronic inflammation. *Immuno. Targets Ther.* **2016**, *5*, 47. [[CrossRef](#)]
7. Papakonstantinou, E.; Piperigkou, Z.; Karamanos, N.K.; Zolota, V. Altered Adipokine Expression in Tumor Microenvironment Promotes Development of Triple Negative Breast Cancer. *Cancers* **2022**, *14*, 4139. [[CrossRef](#)]
8. Gérard, C.; Brown, K.A. Obesity and breast cancer—Role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *466*, 15–30. [[CrossRef](#)]
9. Crujeiras, A.B.; Díaz-Lagares, A.; Carreira, M.C.; Amil, M.; Casanueva, F.F. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: A potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic. Res.* **2013**, *47*, 243–256. [[CrossRef](#)]
10. 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](#)] [[PubMed](#)]
11. Iikuni, N.; Lam, Q.L.; Lu, L.; Matarese, G.; La Cava, A. Leptin and Inflammation. *Curr. Immunol. Rev.* **2008**, *4*, 70–79. [[CrossRef](#)]
12. Surmacz, E. Obesity hormone leptin: A new target in breast cancer? *Breast Cancer Res.* **2007**, *9*, 301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. 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*, 1742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gu, L.; Wang, C.-D.; Cao, C.; Cai, L.-R.; Li, D.-H.; Zheng, Y.-Z. Association of serum leptin with breast cancer: A meta-analysis. *Medicine* **2019**, *98*, e14094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mauro, L.; Naimo, G.D.; Ricchio, E.; Panno, M.L.; Andò, S. Cross-talk between adiponectin and IGF-IR in breast cancer. *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Obeid, S.; Hebbard, L. Role of adiponectin and its receptors in cancer. *Cancer Biol. Med.* **2012**, *9*, 213–220. [[CrossRef](#)]
17. Mantzoros, C.; Petridou, E.; Dessypris, N.; Chavelas, C.; Dalamaga, M.; Alexe, D.M.; Papadiamantis, Y.; Markopoulos, C.; Spanos, E.; Chrousos, G.; et al. Adiponectin and breast cancer risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 1102–1107. [[CrossRef](#)]
18. Jardé, T.; Perrier, S.; Vasson, M.P.; Caldefie-Chézet, F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *Eur. J. Cancer.* **2011**, *47*, 33–43. [[CrossRef](#)]
19. Bhat, H.; Bhat, J.A.; Bhat, M.H.; Rashid, M.; Jan, R.; Afroze, D. Leptin in obesity and hypertension. *Arter. Hypertens.* **2022**, *26*, 26–31. [[CrossRef](#)]
20. Pan, H.; Deng, L.-L.; Cui, J.-Q.; Shi, L.; Yang, Y.-C.; Luo, J.-H.; Qin, D.; Wang, L. Association between serum leptin levels and breast cancer risk: An updated systematic review and meta-analysis. *Medicine* **2018**, *97*, e11345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Karacay, I.A.; Alikanoglu, A.S.; Suren, D.; Ozturk, B.; Karakas, B.R.; Sezer, C. Leptin and leptin receptor expression in breast carcinomas and their relationship with clinicopathological features. *Hum. Path. Rep.* **2022**, *30*. [[CrossRef](#)]
22. Révillion, F.; Charlier, M.; Lhotellier, V.; Hornez, L.; Giard, S.; Baranzelli, M.-C.; Djiane, J.; Peyrat, J.-P. Messenger RNA expression of leptin and leptin receptors and their prognostic value in 322 human primary breast cancers. *Clin Cancer Res.* **2006**, *12*(7Pt1), 2088–2094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mauro, L.; Catalano, S.; Bossi, G.; Pellegrino, M.; Barone, I.; Morales, S.; Giordano, C.; Bartella, V.; Casaburi, I.; Andò, S. Evidences that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: Effects on tumor growth and progression. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 3412–3421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nagalingam, A.; Siddharth, S.; Parida, S.; Muniraj, N.; Avtanski, D.; Kuppusamy, P.; Elsey, J.; Arbiser, J.L.; Györfy, B.; Sharma, D. Hyperleptinemia in obese state renders luminal breast cancers refractory to tamoxifen by coordinating a crosstalk between Med1, miR205 and ErbB. *NPJ Breast Cancer* **2021**, *7*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chen, X.; Zha, X.; Chen, W.; Zhu, T.; Qiu, J.; Røe, O.D.; Li, J.; Wang, Z.; Yin, Y. Leptin attenuates the anti-estrogen effect of tamoxifen in breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2013**, *67*, 22–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Isidori, A.M.; Strollo, F.; Morè, M.; Caprio, M.; Aversa, A.; Moretti, C.; Frajese, G.; Riondino, G.; Fabbri, A. Leptin and aging: Correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weights. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85*, 1954–1962. [[CrossRef](#)]
27. Matsubara, M.; Maruoka, S.; Katayose, S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur. J. Endocrinol.* **2002**, *147*, 173–180. [[CrossRef](#)]
28. Cho, Y.A.; Sung, M.K.; Yeon, J.Y.; Ro, J.; Kim, J. Prognostic role of interleukin-6, interleukin-8, and leptin levels according to breast cancer subtype. *Cancer Res. Treat.* **2013**, *45*, 210–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Obi, N.; Jung, A.Y.; Maurer, T.; Huebner, M.; Johnson, T.; Behrens, S.; Jaskulski, S.; Becher, H.; Chang-Claude, J. Association of circulating leptin, adiponectin, and resistin concentrations with long-term breast cancer prognosis in a German patient cohort. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 23526. [[CrossRef](#)]
30. Gonzalez-Perez, R.R.; Xu, Y.; Guo, S.; Watters, A.; Zhou, W.; Leibovich, S.J. Leptin upregulates VEGF in breast cancer via canonic and non-canonical signalling pathways and NFkappaB/HIF-1alpha activation. *Cell. Signal.* **2010**, *22*, 1350–1362. [[CrossRef](#)]
31. Koda, M.; Sulkowska, M.; Wincewicz, A.; Kanczuga-Koda, L.; Musiatowicz, B.; Szymanska, M.; Sulkowski, S. Expression of leptin, leptin receptor, and hypoxia-inducible factor 1 alpha in human endometrial cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1095*, 90–98. [[CrossRef](#)]
32. Candelaria, P.V.; Rampoldi, A.; Harbuzariu, A.; Gonzalez-Perez, R.R. Leptin signaling and cancer chemoresistance: Perspectives. *World J. Clin. Oncol.* **2017**, *8*, 106–119. [[CrossRef](#)]
33. Pang, Z.-Y.; Wei, Y.-T.; Shang, M.-Y.; Li, S.; Li, Y.; Jin, Q.-X.; Liao, Z.-X.; Cui, M.-K.; Liu, X.-Y.; Zhang, Q. Leptin-elicited PBX3 confers letrozole resistance in breast cancer [published online ahead of print. *Endocr. Relat. Cancer.* **2021**, *28*, 173–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gu, F.; Zhang, H.; Yao, L.; Jiang, S.; Lu, H.; Xing, X.; Zhang, C.; Jiang, P.; Zhang, R. Leptin contributes to the taxol chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 561–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Wprowadzenie do badania opublikowanego w pracy nr 3:

Kwiatkowska K, Rhone P, Koziorzemska P, Formanowicz D, Ruszkowska-Ciastek B. Complex analysis of endothelial markers as potential prognostic indicators in luminal invasive breast carcinoma patients: Outcomes of a six-year observational study. *Biomedicines*. 2023;11(8):2246. IF: 4,70; punktacja MNiSW: 100.000

Powstawanie przerzutów to wieloetapowy proces, podczas którego pierwotne komórki nowotworowe migrują do odległych narządów w celu utworzenia wtórnego miejsca nowotworu. Jest to cecha nowotworów złośliwych, która prowadzi do niepowodzenia leczenia i śmierci wielu pacjentów. W chwili rozpoznania u 5–10% chorych na raka piersi występują przerzuty, a u 30–40% kobiet z wczesnym rakiem piersi przerzuty rozwijają się w trakcie choroby.

Tkanka tłuszczowa jest obecnie uważana za jeden z największych narządów wydzielania wewnętrznego, który wydziela adipokiny, w tym leptynę (prozapalną), adiponektynę (przeciwzapalną). W otyłości, adipocyty są uważane za znaczące źródło przewlekłego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia. Wysokie stężenie leptyny sprzyja proliferacji komórek nowotworowych i hamuje ich apoptozę zaś z niższym stężeniem adiponektyny wiąże się występowanie nowotworów hormonozależnych, tj. raka piersi, endometrium i prostaty. W związku z tym ustalono, że stosunek leptyny do adiponektyny (LAR) jest czułym markerem ogólnoustrojowego stanu zapalnego i czynnikiem predykcyjnym występowania chorób kardiometabolicznych i nowotworowych.

Aktywne komórki śródbłonna naczyniowego uwalniają nadmierne ilości cząsteczek adhezyjnych komórek (CAM) w odpowiedzi na subkliniczny stan zapalny, co powoduje mobilizację i przyleganie leukocytów do śródbłonna naczyniowego. CAM są rodzajem białek, które odgrywają ważną rolę w ruchliwości, różnicowaniu, proliferacji, migracji i apoptozie pierwotnych komórek nowotworowych oraz wnikaniu przez śródbłonek do naczyń krwionośnych podczas procesu przerzutowego raka. Do najbardziej znanych i badanych CAM należą selektyny: selektyna leukocytowa (selektyna L, CD62L), selektyna śródbłonna (selektyna E, CD62E) i selektyna płytkowa (selektyna P, CD62P). Zasadniczą rolą selektyn jest ułatwianie adhezji i toczenia się leukocytów po powierzchni ściany naczynia w środowisku

zapalnym. Jednakże zależne od selektyny rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych wiąże się z adhezją i diapedezą komórek nowotworowych przez śródbłonek naczyńiowy oraz tworzeniem niszy przerzutowej. Pojawienie się ligandów selektyny E na komórkach nowotworowych jest powiązane ze zwiększoną adhezją do aktywowanych komórek śródbłonna naczyńiowego (poprawia przeżycie komórek w czasie przerzutów). P-selektyna umożliwia agregatom komórek nowotworowych przyleganie do śródbłonna naczyńiowego, a następnie ich wynacynienie, jest jednym z białek pośredniczących w ścisłej interakcji między płytkami krwi a komórkami nowotworowymi. Jednak to czynnik von Willebranda jest najsilniejszym markerem aktywacji śródbłonna naczyńiowego. Oprócz swojej roli w adhezji płytek krwi i wtórnej hemostazy, przyczynia się do wzrostu i rozprzestrzeniania się nowotworów.

W publikacji nr 3 badaniem objęto 70 wcześniej nieleczonych pacjentek z klinicznie i histologicznie potwierdzonym pierwotnym, jednostronnym, we wczesnym stadium (IA–IIB), luminalnym A lub B inwazyjnym rakiem piersi bez przerzutów. Szczegółowe informacje odnośnie grupy badanej zostały zawarte zostały na rycinie 20. Głównymi kryteriami wyłączenia były: rak in situ, guz większy niż 5 cm, stopień zaawansowania IIIA lub wyższy, zastosowane wcześniej leczenie neoadjuwantowe, rak miejscowo zaawansowany lub z przerzutami, potrójnie ujemny lub HER2-dodatni nowotwór piersi. Pacjentki obserwowano od chwili rozpoznania nowotworu do daty wznowy lub zgonu raka piersi lub do stycznia 2022 roku, w zależności od tego, co nastąpiło wcześniej.

Celem badania była ocena wpływu markerów śródbłonkowych przed i po leczeniu (tj. sP-selektyny, sE-selektyny i vWF) na LAR (oceny również przed i po leczeniu) oraz przeprowadzenie analizy wartości prognostycznej tych parametrów na przeżycie chorych na inwazyjnego raka piersi typu luminalnego A i B. Aby określić dokładność modelu prognostycznego, w tym badaniu wykorzystano analizę Kaplana-Meiera, regresję liniową i krzywą ROC.

Włączono do analizy 70 pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi bez przerzutów (M0) we wczesnym stadium (stadium I–II). Mediana wieku w chwili rozpoznania nowotworu w całej kohorcie wyniosła 54,5 lat. Wśród 70 kobiet, 26 kobiet (37%) było przed menopauzą i 44 kobiety (63%) po menopauzie. U wszystkich pacjentek (100%) wykazano dodatni status receptorów estrogenowych, a tylko u 5 kobiet (7%) wykazano ujemną ekspresję receptorów progesteronowych. Pięćdziesiąt pacjentek (71%) wykazało ekspresję Ki-67 poniżej 20%. U 61

(87%) kobiet wykryto inwazyjnego raka przewodowego. Średnicę guza mniejszą niż 2 cm stwierdzono w 48 przypadkach (69%). U siedemnastu pacjentek stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych. Na podstawie klasyfikacji TNM raka piersi wykazano 48 chorych (69%) - T1 guzem i 22 chorych (31%) na T2. Mediana średnicy guza wynosiła 1,5 cm. Operację oszczędzającą pierś wykonano u 56 pacjentek, a u 14 wykonano mastektomię. Chemioterapię uzupełniającą zastosowano u 27 chorych, a tylko 2 kobiety nie wymagały leczenia hormonalnego.

W wyniku przeprowadzonych analiz statystycznych **w trzeciej publikacji** porównano związek LAR i markerów śródbłonka naczyniowego z zastosowanym leczeniem. Niezależnie od zastosowanego schematu leczenia LAR i markery śródbłonka wzrosły po leczeniu. Biorąc pod uwagę rodzaj chemioterapii, stężenia sE-selektyny przed leczeniem były wyższe u pacjentów leczonych chemioterapią opartą na taksanach. Zaskakujące jest to, że stężenia sE-selektyny po leczeniu były wyższe u pacjentów, którzy nie byli leczeni chemioterapią. Biorąc pod uwagę rodzaje terapii hormonalnej, stężenia sP-selektyny po leczeniu były wyższe u pacjentek nieleczonych hormonalnie, jednak obserwacja ta wymaga potwierdzenia w liczniejszej grupie. Stężenia vWF po leczeniu były wyższe u pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię opartą na antracyklinie. Następnie, dokonano analizy korelacji parametrów klinicznych zarówno przed leczeniem jak i po nim wykorzystując do tego korelację rang Spearmana. Stwierdzono, że markery stosowane przed leczeniem (sP-selektyna, sE-selektyna i LAR) korelują dodatnio z ich odpowiednikami po leczeniu.

Kolejnym krokiem analizy statystycznej było określenie powiązania markerów LAR i śródbłonka naczyniowego przed i po leczeniu oraz przeżycia wolnego od progresji choroby za pomocą regresji liniowej. Wyższe ryzyko nawrotu raka piersi wiązało się z niższym stężeniem sP-selektyny po leczeniu wykrytym metodą regresji liniowej w Modelu 3 skorygowanym o wiek, BMI, liczbę porodów, stan menopauzalny i palenie tytoniu.

Następnie, wykonano krzywe Kaplana-Meiera w celu określenia całkowitego przeżycia i przeżycia wolnego od choroby (DFS, ang. disease-free survival). Uzyskano następujące punkty odcięcia na podstawie mediany: sP-selektyna przed leczeniem – 265,05 mg/ml, LAR po leczeniu – 0,82 oraz na podstawie krzywej ROC: sP-selektyna przed leczeniem- 247,40 ng/ml, LAR po leczeniu – 0,83. W ciągu 68,5 miesiąca obserwacji stwierdzono 10 zgonów związanych z nowotworem. Tylko u jednej pacjentki wystąpił nawrót. Pacjentki ze stężeniem sP-selektyny przed leczeniem niższym niż 265,05 ng/ml wykazywały znacznie dłuższy okres wolny od

progresji choroby niż pacjenci z poziomem sP-selektyny przed leczeniem wyższym niż 265,05 ng/ml (wartość odcięcia na podstawie mediany). Dodatkowo, pacjentki ze stężeniem sP-selektyny przed leczeniem poniżej 247,40 ng/ml (punkt odcięcia krzywej ROC) wykazywały lepszy DFS niż pacjentki ze stężeniem sP-selektyny przed leczeniem powyżej 247,40 ng/ml. Ponadto, pacjentki z poziomem LAR po leczeniu poniżej 0,82 mieli istotnie dłuższe OS i DFS niż pacjenci z poziomem LAR po leczeniu powyżej 0,82 zgodnie z medianą odcięcia. Dodatkowo pacjenci z poziomem LAR po leczeniu poniżej 0,83 mieli lepszy OS i DFS niż pacjenci z poziomem LAR po leczeniu powyżej 0,83 zgodnie z punktem odcięcia na podstawie krzywej ROC.

W celu określenia wartości prognostycznej analizowanych parametrów wykonano jednowymiarowe i wielowymiarowe modele regresji proporcjonalnego hazardu Coxa. W skorygowanej analizie regresji logistycznej odnotowującej wzrost ryzyka nawrotu choroby wraz ze wzrostem wartości LAR przed leczeniem według mediany, a także wartości LAR po leczeniu według obu punktów odcięcia dla czasu wolnego od choroby wykazały wartości prognostyczne. Zgodnie z punktem odcięcia krzywej ROC wyższe stężenie vWF po leczeniu wiązało się ze wzrostem ryzyka nawrotu choroby. Jednakże stężenie sE-selektyny przed leczeniem i stężenie vWF z wartością odcięcia ROC wskazywały przeciwne powiązania dla czasu wolnego od choroby. Jednoczynnikowy model regresji Coxa potwierdził podobne powiązania jak w analizie wieloczynnikowej w odniesieniu do wartości LAR po leczeniu i stężenia vWF przed leczeniem w obu przypadkach zgodnie z punktami odcięcia ROC.

Z badania wynika, że zastosowane leczenie, niezależnie od schematu leczenia najprawdopodobniej zwiększyło stężenia LAR i markerów endotelialnych. Markery komórek śródbłonna naczyniowego po leczeniu są dodatnio skorelowane ze stężeniem tych parametrów przed leczeniem, ale także z zastosowanym schematem leczenia oraz ze średnicą guza, stopniem złośliwości i zajęciem węzłów chłonnych. Ponadto, wydaje się, że stężenie LAR po leczeniu jest powiązane z przyszłymi wynikami u pacjentów z luminalnym nowotworem piersi - stężenie LAR wyższe niż 0,82 (mediana odcięcia) i 0,83 (odcięcie na podstawie krzywej ROC) zwiększają prawdopodobieństwo nawrotów i śmiertelności w grupie badanej. Stężenie sP-selektyny przed leczeniem wydają się być powiązane z przyszłymi wynikami u pacjentów z luminalnym rakiem piersi, przy stężeniach LAR powyżej 265,05 ng/ml (mediana odcięcia) i 247,40 ng/ml (odcięcie na podstawie krzywej ROC) zaobserwowano zwiększenie prawdopodobieństwa nawrotu i śmierci w grupie badanej.

W oparciu o cztery modele regresji liniowej jedynie stężenie sP-selektyny przed leczeniem wykazały wartość prognostyczną. Wyższe stężenia sP-selektyny przed leczeniem i po leczeniu były głównie związane z krótszym czasem wolnym od progresji choroby w grupie pacjentek z luminalnym rakiem piersi.



Article

Complex Analysis of Endothelial Markers as Potential Prognostic Indicators in Luminal Invasive Breast Carcinoma Patients: Outcomes of a Six-Year Observational Study

Katarzyna Kwiatkowska ^{1,*}, Piotr Rhone ², Paulina Koziorzemska ¹ , Dorota Formanowicz ^{3,4} and Barbara Ruszkowska-Ciastek ^{1,*}

¹ Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum, 85-094 Bydgoszcz, Poland; koziorzemska@gmail.com

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

³ Department of Medical Chemistry and Laboratory Medicine, Poznan University of Medical Sciences, 60-806 Poznan, Poland; doforman@ump.edu.pl

⁴ Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, Institute of Natural Fibres and Medicinal Plants-National Research, 62-064 Plewiska, Poland

* Correspondence: katarzynakwiatkowska@abs.umk.pl (K.K.); ruszkowska.basia@gmail.com (B.R.-C.)

Abstract: (1) Background: Metastasis is a complex process in which the primary cancer cells spread to a distant organ or organs, creating a secondary tumor location, which in many patients leads to treatment failure and death. The aim of the present study was to assess the association of endothelial markers (i.e., sP-selectin, sE-selectin and von Willebrand factor) with the leptin-to-adiponectin ratio (LAR) and to perform an analysis of the predictive value on the survival of patients with luminal A and B invasive breast cancer (IBrC). (2) Methods: The trial included 70 treatment-naïve early-stage IBrC patients with a median age of 54.5 years and a median tumor diameter of 1.5 cm. The median duration of follow-up was 5.7 years, with a relapse rate of 15.71%. Specific immunoenzymatic kits were used to determine pre- and post-treatment concentrations of analyzed factors. (3) Results: Regardless of the treatment pattern, endothelial marker concentrations and the LAR increased after adjuvant treatment. The follow-up showed a significantly higher relapse rate in patients with IBrC who had higher pre-treatment sP-selectin and post-treatment LAR levels. According to receiver operating characteristic (ROC) analysis, a post-treatment LAR with a sensitivity of 88.9% and specificity of 57.9% discriminating cases with or without disease relapse. Additionally, a higher risk of breast cancer relapse was associated with a lower post-treatment sP-selectin concentration. (4) Conclusions: Our results showed mainly that pre-treatment sP-selectin levels and post-treatment LAR may have value as prognostic indicators and may contribute to predicting the future outcomes in patients with early-stage IBrC.

Keywords: breast cancer; LAR; sP-selectin; sE-selectin; von Willebrand factor; relapse; treatment



Citation: Kwiatkowska, K.; Rhone, P.; Koziorzemska, P.; Formanowicz, D.; Ruszkowska-Ciastek, B. Complex Analysis of Endothelial Markers as Potential Prognostic Indicators in Luminal Invasive Breast Carcinoma Patients: Outcomes of a Six-Year Observational Study. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2246. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082246>

Academic Editor: Khalid Sossey-Alaoui

Received: 27 May 2023

Revised: 22 July 2023

Accepted: 9 August 2023

Published: 10 August 2023



Copyright: © 2023 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/>).

1. Introduction

Metastasis is a multi-step process by which primary tumor cells migrate to a distant organ(s) in order to create a secondary tumor site. It is a characteristic of cancer that leads to treatment failure and the death of many patients [1]. As a result, the prognosis of the patient is closely related to metastasis. At diagnosis, 5–10% of breast cancer patients have metastases, and 30–40% of women with early breast cancer develop metastases during the disease [2,3]. Breast cancer is a clinically, pathologically, histologically, and prognostically complex disease and the classification that is important to determine treatment and the future outcome is based on analysis of the estrogen receptor (ER), the progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and proliferation marker (Ki67).

Estimation of these molecular indicators enables distinguishing four general intrinsic breast cancer subtypes: luminal A, luminal B (hormonal receptor positive), non-luminal HER2 positive, and triple negative. These subtypes have a wide range of metastases, prognoses, and treatment options [4]. Different gene and protein expression profiles are likely to explain the different patterns of metastasis and survival in different breast cancer subtypes [5].

Adipose tissue is now considered to be one of the largest endocrine organs, which secretes dozens of adipokines, including leptin (pro-inflammatory), adiponectin (anti-inflammatory), resistin, interleukin-1 (IL-1), and interleukin-6 (IL-6) [6]. By excessive release of free fatty acids, tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-1, IL-6, and other mediators regulate endothelial function and induce endothelial damage. Thus, adipocytes are regarded as a significant source of chronic low-grade inflammation. Endothelial cells release excessive amounts of cell adhesion molecules (CAMs), such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and E-selectin in response to subclinical inflammation, resulting in leukocyte mobilization and adherence to the endothelium [7].

CAMs are a type of protein that play an important role in the motility, differentiation, proliferation, migration, and apoptosis of primary tumor cells and intravasation through the endothelium into blood vessels during the metastatic process of cancer. CAMs are responsible for maintaining tissue continuity under physiological conditions by interacting with cells and the extracellular matrix [8–10]. Impaired adhesion molecule function at any stage can contribute to the loss of normal cell–cell interactions, allowing cancer cells to dedifferentiate and spread [8]. The most recognized and studied CAMs include selectins. Leukocyte-selectin (L-selectin, CD62L), endothelial-selectin (E-selectin, CD62E) and platelet-selectin (P-selectin, CD62P) are the three selectin subfamily members [11]. The essential role of selectins is facilitation of leukocyte adhesion and rolling on the vessel wall surface in the inflammatory milieu. However, selectin-dependent tumor cell spread is linked with attachment and diapedesis of tumor cells through the endothelium and formation of a metastatic niche [12,13].

The appearance of E-selectin ligands on cancer cells, for example, mucins, dead receptor-3 and a specific CD44 glycoform, is linked to increased adhesion to activated endothelial cells. The binding of E-selectin to death receptor 3 or other ligands on cancer cells has been shown to improve survival during metastasis [14,15]. Soluble platelet-selectin (sP-selectin) is a soluble form of P-selectin that is released by granules and is detectable in plasma [16]. P-selectin, which allows tumor cell aggregates to adhere to the endothelium and then extravasate, is one of the proteins that mediates the close interaction between platelets and tumor cells [17,18]. However, the most powerful endothelial activation marker is von Willebrand factor (vWF). Despite its role in platelets adhesion and secondary coagulation, it contributes to cancer growth and dissemination [19]. Disease progression and worse future prognosis were associated with high vWF levels by Dhimi et al., who suggest that the vWF concentration may serve as an independent prognostic marker in neoplastic disease [20]. Rhone et al. noted opposite results since a lower concentration of vWF was related to a shorter survival rate [21]. Discrepancies in this regard might be associated with an unrevealed role of vWF in cancerogenesis.

Interestingly, leptin and adiponectin are the major adipokines, which present opposite properties in metabolism, immune response, reproductive process and cancerogenesis. A high concentration of leptin promotes cancer cell proliferation and diminishes its apoptosis [22]. Numerous hormone-dependent cancers are associated with a lower adiponectin concentration, i.e., breast, endometrial, and prostate [22–24]. Thus, the leptin-to-adiponectin ratio (LAR) was established as a sensitive systemic inflammatory marker and predictor of cardiometabolic and neoplastic disease outcomes [7]. Since, Słomian et al. observed that lower LAR was associated with a longer survival rate and better therapy response. Additionally, adiponectin and leptin investigated separately do not correspond to the stage of ovarian cancer and response to chemotherapy [25]. Iwan-Zietek et al. have found an inverse

association between the LAR and soluble form of P-selectin in morbidly obese patients, which may suggest reduced platelet aggregation [26]. Thus, the aim of the present study was to assess the effect of endothelial markers before and after treatment (i.e., sP-selectin, sE-selectin and vWF) on the LAR (also assessed before and after treatment) and perform an analysis of the predictive value of these parameters on the survival of patients with luminal A and B invasive breast cancer (IBrC). To determine the accuracy of our predictive model, we used Kaplan–Meier analysis, linear regression, and the receiver operating characteristic (ROC) curve in this study.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Enrolment

This study included 70 previously untreated patients with clinically and histologically proven primary, invasive, unilateral, non-metastatic, early-stage (IA–IIB) IBrC. The flowchart of patients enrolled for this study is shown in Figure 1.

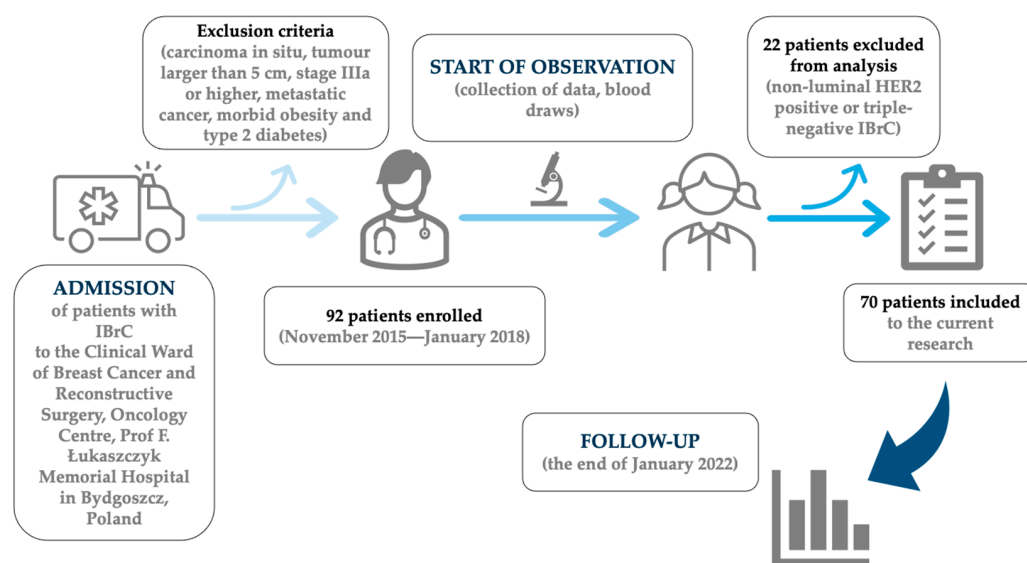


Figure 1. Flowchart of the current research.

2.2. Tumor Characteristics

Comprehensive patient clinico-pathological characteristics are presented in Table 1. All patients showed positive estrogen receptor status and only 5 women demonstrated progesterone receptor-negative staining. Fifty patients demonstrated lower than 20% expression of Ki-67. Invasive ductal carcinoma was detected in 61 (87%) women. Tumor diameter lower than 2 cm was exhibited in 48 cases (69%). Seventeen patients demonstrated lymph node metastasis. Based on these facts, 50% (35 cases) of the study group had stage I IBrC.

2.3. Follow-Up

Patients were followed from the date of IBrC diagnosis until the date of breast cancer recurrence or death or until January 2022, whichever came first. The period from study inclusion to the date of recurrence is described as disease-free survival (DFS), and the time to the patient's last visit or death is defined as overall survival (OS). The median follow-up was 68.5 months (IQR = 59–72 months). There were 11 events during this study, including one distant metastasis and ten deaths (recurrence rate: 15.71%).

2.4. Ethics Statement

This study was performed under the appropriate institutional ethics approvals (KB 547/2015) and in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each participant.

Table 1. Preliminary and clinical characteristics of the study group.

| Demographic and Clinical Data | Overall (n = 70) | Patients without Progression (n = 59) | Patients with Progression (n = 11) |
|-----------------------------------|------------------|--|---------------------------------------|
| | n (%) | | |
| Age | | | |
| <55 years | 35 (50%) | 30 (51%) | 5 (45.5%) |
| >55 years | 35 (50%) | 29 (49%) | 6 (54.5%) |
| Menopausal status | | | |
| Pre-menopausal | 26 (37%) | 22 (37%) | 4 (36%) |
| Post-menopausal | 44 (63%) | 37 (63%) | 7 (64%) |
| BMI (kg/m ²) | | | |
| Normal (18.5 ≤ 24.99) | 34 (48.6%) | 27 (46%) | 7 (64%) |
| Overweight (25 ≤ 29.99) | 23 (32.8%) | 22 (37%) | 1 (9%) |
| Obese (>30) | 13 (18.6%) | 10 (17%) | 3 (27%) |
| Parity status | | | |
| 0 | 6 (9%) | 3 (5%) | 3 (27.2%) |
| 1–2 | 50 (71%) | 46 (78%) | 4 (36.4%) |
| 3 and more | 14 (20%) | 10 (17%) | 4 (36.4%) |
| Localization of tumor | | | |
| Right breast | 36 (51%) | 31 (53%) | 5 (45.5%) |
| Left breast | 34 (49%) | 28 (47%) | 6 (54.5%) |
| Lymph node status | | | |
| N0 | 53 (76%) | 46 (78%) | 7 (64%) |
| N1 | 17 (24%) | 13 (22%) | 4 (36%) |
| Histological type | | | |
| IDC | 61 (87%) | 51 (86%) | 10 (91%) |
| ILC | 9 (13%) | 8 (14%) | 1 (9%) |
| TNM staging classification | | | |
| T1 | 48 (69%) | 44 (75%) | 4 (36%) |
| T2 | 22 (31%) | 15 (25%) | 7 (64%) |
| Grade according to Elston–Ellis | | | |
| 1 + 2 | 61 (87%) | 53 (90%) | 8 (73%) |
| 3 | 9 (13%) | 6 (10%) | 3 (27%) |
| Molecular type | | | |
| Luminal A (HR+/HER2−/Ki-67 < 20%) | 50 (71%) | 46 (78%) | 4 (36%) |
| Luminal B (HR+/HER2−/Ki-67 ≥ 20%) | 16 (23%) | 10 (17%) | 6 (55%) |
| Luminal B HER2+ (HR+ HER2+) | 4 (6%) | 3 (5%) | 1 (9%) |
| Stage | | | |
| I | 35 (50%) | 33 (56%) | 2 (18%) |
| II | 35 (50%) | 26 (44%) | 9 (82%) |
| Progesterone receptor (PR) | | | |
| Negative | 5 (7%) | 3 (5%) | 2 (18%) |
| Positive | 65 (93%) | 56 (95%) | 9 (82%) |
| E-cadherin | | | |
| Negative | 5 (7%) | 5 (8%) | 0 |
| Positive | 65 (93%) | 54 (92%) | 11 (100%) |
| Ki-67 | | | |
| <20% | 50 (71%) | 45 (76%) | 5 (45.5%) |
| ≥20% | 20 (29%) | 14 (24%) | 6 (54.5%) |

BMI: body mass index; N0: lack of lymph node metastases; N1: spread to auxiliary lymph nodes; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma; T1: tumor diameter < 2 cm; T2: tumor diameter > 2 cm to <5 cm; HR+: hormone receptor positive; HER2−: human epidermal growth factor receptor 2 negative; HER2+: human epidermal growth factor receptor 2 positive; Ki67: marker of proliferation.

2.5. Treatment Requirements

All individuals were treated in accordance with the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines for Practice. Fifty-six patients received breast-conserving surgery (BCS), seven had a conventional mastectomy, and seven underwent a modified radical mastectomy (MRM). All surgical operations were performed under normal proce-

dures. Adjuvant therapy was given to 68 women. Surgery was the initial treatment for all research participants, followed by adjuvant therapy that included radiation, brachytherapy, hormone therapy, chemotherapy, and immunotherapy. Post-operative radiation was mostly given to patients who had undergone BCS. In the study group, post-operative radiation was delivered in 17–20 fractions over 4–6 weeks using X photons with energy of 6/15 MeV and a dosage of 42.5 gray (Gy). Moreover, brachytherapy at a dosage of 10 Gy was administered to the tumor bed in half of the women. Adjuvant chemotherapies included anthracycline-containing ($n = 23$) and non-anthracycline-containing ($n = 4$) medicines administered in three to six cycles. Menopausal status determined the type of endocrine treatment; 40 (57%) received tamoxifen (Egis Pharmaceuticals, Budapest, Hungary), 17 (24%) received aromatase inhibitors (AIs) (Arimidex [anastrozole], AstraZeneca, Cambridge, UK), and 7 (10%) received a combination of tamoxifen and AIs. Adjuvant immunotherapy was necessary for four HER2-positive individuals (6%) (trastuzumab).

2.6. Sample Collection and Analysis

Venous blood samples were taken twice into 4.5 mL tubes (BD Vacutainer[®] Plus Plastic Serum Tubes, Franklin Lakes, NJ, USA) without anticoagulant to determine adiponectin, leptin, and soluble forms of E-selectin (sE-selectin) and P-selectin (sP-selectin) concentrations. In tubes (BD[™] Vacutainer[™] Citrate Tube) containing an anticoagulant additive equivalent to 3.2% trisodium citrate for coagulation investigations, 4.5 mL for von Willebrand factor analysis were collected. Material was gathered under strict condition. Samples taken for lab analyses were confined to one freeze–thaw cycle.

The first blood sample was taken 24 h before the surgical procedure (I—pre-treatment values). In order to minimize effects of adjuvant treatment, the subsequent blood specimen (II—post-treatment) was collected nine months (IQR = 6.0–10.0) after the cancer surgery.

2.6.1. Leptin-to-Adiponectin Ratio

The Human Leptin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Clinical Range (BioVendor Research and Diagnostic Products, Brno, Czech Republic; catalogue number: RD191001100) were used to measure baseline serum pre- and post-treatment leptin concentrations. The detection limit for leptin was 0.2 ng/mL. The intra-assay coefficient of variation (within run) was 5.9%, with a run-to-run coefficient of variation of 5.6%.

A human adiponectin ELISA high-sensitivity ELISA kit was used to measure pre- and post-treatment serum adiponectin levels (BioVendor Research and Diagnostic Products, Brno, Czech Republic; catalogue number: RD191023100). The detection limit for adiponectin was 0.47 ng/mL, with a 3.9% intra-assay coefficient of variation (within-run) and a 6.0% inter-assay coefficient of variation (run-to-run).

The leptin-to-adiponectin ratio was assessed using the following formula:

$$LAR = \frac{\text{leptin}}{\text{adiponectin}}.$$

2.6.2. Serum sE-Selectin Measurements

Serum pre- and post-treatment sE-selectin level were determined by the Diaclone CD62E/ELAM-1 ELISA Set (Diaclone SAS, Besancon Cedex, France; catalogue number: 851.580). The detection limit was 0.5 ng/mL, with an assay range of 1 ng/mL to 32 ng/mL.

2.6.3. Serum sP-Selectin Analysis

Serum pre- and post- treatment sP-selectin level were measured using a commercially available kit, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit for sP-selectin (SELP) (Cloud-Clone Corp., Katy, TX, USA, catalogue number: SEA569Hu). The sP-selectin detection limit was 27 pg/mL. The intra-assay coefficient of variation (within-run) was 10%, with an inter-assay coefficient of variation (run-to-run) of 12%.

2.6.4. Von Willebrand Factor Antigen Measurements

Plasma pre- and post-treatment concentrations of von Willebrand factor were determined using the Imubind[®] vWF ELISA ref: 828 (BioMedica Diagnostics, Stamford, CT, USA) test. The vWF detection limit was 0.1 mU/mL, with an assay range of 0–10 mU/mL.

2.6.5. Immunohistochemistry (IHC) Analysis

The evaluation of ER and PR status, expression of HER2, and Ki67 was done using IHC. ER and PR status were evaluated using SP1 and 1E2 primary antibodies (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) in line with ASCO and CAP standards. Hormone receptor status was characterized as positive if there was at least 1% of tumor cells with nuclear staining and negative if there was no nuclear staining at all. The rabbit monoclonal primary antibody VENTANA anti-HER2/neu (4B5) was used with a VENTANA aperture to stain the IHC microscope slide (Benchmark Ultra, Roche-Ventana) for semi-quantitative identification of HER2. On a scale of 0, 1+, 2+, and 3+, HER2 scores were calculated using the usual ASCO/CAP guideline reporting method. Tumors with a score of 0 or 1+ were classified as HER2 negative, whereas those with a value of 3+ were labelled HER2 positive. Tumors with 2+ scores were deemed ambiguous and subjected to fluorescence in situ hybridization (FISH) with a dual HER2/Cep17 probe. Using a monoclonal mouse antibody (Auto-stainer Link 48, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), the Ki67 antigen was scored as a percentage of nuclei-stained cells in all cancer cells. We utilized a 20% threshold to designate high or low proliferative instances in the Ki67 proliferation index.

2.7. Statistical Analysis

Statistica version 13.1 (StatSoft[®], Cracow, Poland) was used for statistical analysis. The Shapiro–Wilk test was used to ensure that the data distribution was normal. Student's *t*-test (normal distribution) or the Mann–Whitney U test was used to compare two groups of continuous data (non-normal distribution). Univariate ANOVA analysis with normal distributions or the Kruskal–Wallis ANOVA analysis with non-normal distributions was used to compare more than two groups of continuous data. As appropriate, patient data are presented as the mean and standard deviation or median and interquartile range (IQR). In brackets '()', we have given the standard deviation and the values separated by a slash '/' are Q1 and Q3. In addition, the data for two dependent variables were compared using a non-parametric Wilcoxon signed rank test. The relationships between the parameters under investigation were examined using Spearman's rank order correlation test. The investigation also included the use of ROC curves, AUC (area under a curve), and Youden's index (see Supplementary Materials). Cut-off values were determined based on the ROC and median. Survival times were expressed using Kaplan–Meier curves, and the log-rank test was utilized to compare survival times (statistically non-significant results have been moved in the Supplementary Materials). The term OS refers to the time between the start of randomization or treatment and death. DFS refers to the interval between randomization or the start of a treatment and the occurrence of disease progression or death. The link between two or more independent variables and one dependent variable was estimated using multiple linear regression. The Cox proportional hazards model was used for multivariate and univariate regression analysis. To assess the independent impact of selected factors at the time of diagnosis on breast cancer survival, a multivariate Cox regression model included all variables with a significant effect in the univariate analysis. All analyses performed were summarized and reported in tables and figures. The statistical significance cut-off value was set at a *p*-value < 0.05.

3. Results

3.1. Baseline Characteristics

We identified seventy women with non-metastatic (M0), early-stage (stage I–II) invasive breast cancer. Table 1 and Figure 1 demonstrate baseline patients characteristics. Median (IQR—interquartile range) age at cancer diagnosis in the overall cohort was

54.5 (49.0–59.0) years. There were 26 premenopausal women and 44 postmenopausal women among the 70 women. There were 48 T1 patients and 22 T2 patients in the TNM classification of breast cancer. The median (IQR) tumor diameter was 1.5 (1.1–2.1) cm. BCS was performed on 56 patients, and 14 had a mastectomy. Adjuvant chemotherapy was administered in 27 patients and 2 women did not require endocrine treatment. All patients were identified to explore the prognostics and future outcomes.

3.2. LAR Levels Prior to and after Treatment in Relation to the Types of Therapy

Table 2 presents the LAR regarding the types of therapy. Regardless of the treatment pattern, the LAR increased after treatment.

Table 2. Treatment characteristics of patients in respect of LAR.

| Feature/Number of Patients | Pre-Treatment LAR Value | Post-Treatment LAR Value | <i>p</i> -Value |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|
| Surgery | <i>p</i> = 0.2260 | <i>p</i> = 0.8974 | |
| BCS + Radiotherapy—BCT | 0.35 | 0.83 | 0.0192 |
| 56 | 0.11/0.59 | 0.33/1.39 | |
| Mastectomy | 0.47 | 0.8 | 0.0005 |
| 14 | 0.21/0.78 | 0.40/1.35 | |
| Chemotherapy | <i>p</i> = 0.1458 | <i>p</i> = 0.3883 | |
| Anthracycline based | 0.28 | 0.73 | 0.0089 |
| 23 | 0.12/0.60 | 0.24/1.23 | |
| Non-anthracycline | 0.61 | 1.05 | 0.4652 |
| 4 | 0.15/1.48 | 0.43/2.17 | |
| No | 0.47 | 0.83 | 0.0014 |
| 43 | 0.21/0.83 | 0.46/1.35 | |
| Endocrine therapy * | <i>p</i> = 0.5473 | <i>p</i> = 0.1923 | |
| Tamoxifen | 0.48 | 0.71 | <u>0.0708</u> |
| 40 | 0.22/0.79 | 0.36/1.22 | |
| Inhibitor aromatase | 0.4 | 1.15 | 0.0042 |
| 17 | 0.24/0.56 | 0.52/1.42 | |
| Tamoxifen and inhibitor aromatase | 0.61 | 1.17 | 0.0280 |
| 7 | 0.18/1.02 | 0.84/1.93 | |

Data are expressed as the median (Me) and interquartile range (IQR); *p*-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold, underlined *p*-values represent closeness to statistical significance. BCS: breast-conserving surgery; BCT: breast-conserving therapy. * Due to limited space in the manuscript and lack of the significance patients with other types of hormonal therapy (four cases) and without endocrine therapy (two patients) were removed.

3.3. Patients' Treatment in Relation to Their Pre- and Post-Treatment sE-Selectin Concentrations

Table 3 presents the sE-selectin concentrations related to treatment strategy. Regardless of the treatment pattern, the sE-selectin concentration increased after treatment. The pre-treatment sE-selectin concentrations were higher in patients who received breast-conserving therapy with a trend towards statistical significance (*p* = 0.0840). Considering the types of chemotherapy, pre-treatment sE-selectin concentrations were higher in patients treated with non-anthracycline chemotherapy (*p* = 0.0125). Surprisingly, post-treatment sE-selectin concentrations were higher in patients who had not been treated with chemotherapy (*p* = 0.0081).

3.4. Relationship between sP-Selectin Concentrations before and after Treatment

Table 4 presents the sP-selectin concentrations with regard to the types of therapy. Regardless of the treatment pattern, the sP-selectin concentration increased after treatment. Considering the types of endocrine therapy, post-treatment sP-selectin concentrations were higher in patients who had not been treated with endocrine therapy (*p* = 0.0015), but this observation needs to be confirmed in a group with larger numbers.

Table 3. Treatment characteristics of patients in respect of sE-selectin.

| Feature/Number of Patients | Pre-Treatment sE-Selectin Concentration (ng/mL) | Post-Treatment sE-Selectin Concentration (ng/mL) | p-Value |
|-----------------------------------|---|--|---------|
| Surgery | $p = 0.0840$ | $p = 0.7225$ | |
| BCS + Radiotherapy—BCT | 35.36 | 147.23 | <0.0001 |
| 56 | 29.20/45.60 | (59.43) | |
| Mastectomy | 28.59 | 153.85 | 0.0015 |
| 14 | 21.95/36.51 | (62.49) | |
| Chemotherapy | $p = 0.0125$ | $p = 0.0081$ | |
| Anthracycline | 29.7 | 128.42 | 0.0001 |
| 23 | 21.72/35.56 | 77.02/143.96 | |
| Non-anthracycline | 37.89 | 171.61 | 0.0679 |
| 4 | 36.69/51.95 | 159.55/205.32 | |
| No | 35.36 | 180.58 | <0.0001 |
| 43 | 28.31/47.40 | 92.56/202.70 | |
| Endocrine therapy * | $p = 0.4964$ | $p = 0.1460$ | |
| Tamoxifen | 35.36 | 133.44 | <0.0001 |
| 40 | 26.89/45.10 | 81.38/187.20 | |
| Inhibitor aromatase | 32.5 | 165.55 | 0.0003 |
| 17 | 30.20/62.50 | 135.93/224.24 | |
| Tamoxifen and inhibitor aromatase | 33.79 | 179.26 | 0.0180 |
| 7 | 21.54/38.90 | 128.42/229.48 | |

Data are expressed as the median (Me) and interquartile range (IQR) or means \pm standard deviation; p -values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold, underlined p -values represent closeness to statistical significance. BCS: breast-conserving surgery; BCT: breast-conserving therapy. * Due to limited space in the manuscript and lack of the significance patients with other types of hormonal therapy (4 cases) and without endocrine therapy (2 patients) were removed.

Table 4. Treatment characteristics of patients in respect of sP-selectin.

| Feature/Number of Patients | Pre-Treatment sP-Selectin Concentration (ng/mL) | Post-Treatment sP-Selectin Concentration (ng/mL) | p-Value |
|-----------------------------------|---|--|---------|
| Surgery | $p = 0.3709$ | $p = 0.4295$ | |
| BCS + Radiotherapy—BCT | 253.95 | 1687.86 | <0.0001 |
| 56 | 190.40/344.10 | 1051.14/2447.81 | |
| Mastectomy | 342.5 | 2071.25 | 0.0015 |
| 14 | 184.30/383.25 | 1617.68/2508.57 | |
| Chemotherapy | $p = 0.4316$ | $p = 0.9237$ | |
| Anthracycline | 266.95 | 1864.48 | 0.0001 |
| 23 | 177.5/344.10 | (781.04) | |
| Non-anthracycline | 299.3 | 1607.3 | 0.0679 |
| 4 | 188.63/439.60 | (739.12) | |
| No | 263.15 | 1886.39 | <0.0001 |
| 43 | 193.05/383.25 | (881.77) | |
| Endocrine therapy * | $p = 0.2307$ | $p = 0.0015$ | |
| Tamoxifen | 286 | 1859.1 | <0.0001 |
| 40 | 197.65/380.35 | (820.91) | |
| Inhibitor aromatase | 276.65 | 1947.98 | 0.0003 |
| 17 | 192.15/359.40 | (965.53) | |
| Tamoxifen and inhibitor aromatase | 247.4 | 2055.24 | 0.0180 |
| 7 | 177.50/344.10 | (729.06) | |

Data are expressed as the median (Me) and interquartile range (IQR) or means \pm standard deviation; p -values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold. BCS: breast-conserving surgery; BCT: breast-conserving therapy. * Due to limited space in the manuscript and lack of the significance patients with other types of hormonal therapy (four cases) and without endocrine therapy (two patients) were removed.

3.5. vWF Concentrations Prior to and after Treatment in Relation to the Types of Therapy

Table 5 shows the vWF concentrations in relation to therapy type. The vWF concentration increased after treatment regardless of treatment pattern. Post-treatment vWF concentrations were higher in patients who received chemotherapy based on anthracycline ($p = 0.0486$).

Table 5. vWF-related patient treatment characteristics.

| Feature/Number of Patients | Pre-Treatment vWF Concentration (mU/mL) | Post-Treatment vWF Concentration (mU/mL) | p-Value |
|-----------------------------------|---|--|-------------------|
| Surgery | $p = 0.9095$ | $p = 0.2041$ | |
| BCS + Radiotherapy—BCT | 575.61 (240.3) | 2254.19 1473.88/2928.03 | <0.0001 |
| Mastectomy | 567.21 (270.85) | 1633.26 1299.04/2730.81 | 0.0012 |
| Chemotherapy | $p = 0.6517$ | $p = 0.0486$ | |
| Anthracycline | 582.5 (219.47) | 2579.4 1902.00/3242.13 | <0.0001 |
| Non-anthracycline | 745.85 (140.01) | 1665.7 1578.01/1950.54 | 0.0679 |
| No | 553.2 (260.08) | 1802.17 1290.09/2798.43 | <0.0001 |
| Endocrine therapy * | $p = 0.3784$ | $p = 0.5300$ | |
| Tamoxifen | 569.9 439.00/737.70 | 2038.18 1290.09/2865.13 | <0.0001 |
| Inhibitor aromatase | 700 500.00/811.80 | 1873.39 1564.76/2898.46 | 0.0003 |
| Tamoxifen and inhibitor aromatase | 569.9 111.00/600.00 | 2392.3 920.97/3919.44 | 0.0180 |

Data are expressed as the median (Me) and interquartile range (IQR) or means \pm standard deviation; p -values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold. BCS: breast-conserving surgery; BCT: breast-conserving therapy. * Due to limited space in the manuscript and lack of the significance patients with other types of hormonal therapy (four cases) and without endocrine therapy (two patients) were removed.

3.6. Association between Endothelial Markers and Pre-Treatment LAR Values

The next step in the statistical analysis (Table 6) was to test the pre-treatment and post-treatment concentrations of sE-selectin, sP-selectin and vWF against the pre-treatment LAR value. We divided the breast cancer patients into three subgroups—those with low (<0.27), moderate (0.27 – 0.65) and high (>0.65) pre-treatment LAR values. No statistically significant data were observed in this analysis.

Table 6. Endothelial markers according to pre-treatment LAR values.

| | Pre-Treatment LAR Low Value (<0.27) $n = 23$ | Pre-Treatment LAR Moderate Value (0.27 – 0.65) $n = 25$ | Pre-Treatment LAR High Value (>0.65) $n = 22$ | p-Value |
|--|--|---|---|---------|
| Pre-Treatment sE-selectin Concentration (ng/mL) | 29.76 25.25/36.87 | 32.91 27.61/48.05 | 40.95 32.11/46.00 | 0.1391 |
| Post-Treatment sE-selectin Concentration (ng/mL) | 131.55 81.13/172.55 | 165.17 84.31/224.24 | 179.26 116.55/192.51 | 0.2829 |
| Pre-Treatment sP-selectin Concentration (ng/mL) | 252.1 177.50/327.95 | 308.08 215.75/378.08 | 247.4 210.60/383.25 | 0.532 |
| Post-Treatment sP-selectin Concentration (ng/mL) | 1916.87 (821.54) | 1941.61 (821.33) | 1870.24 (866.22) | 0.9607 |
| Pre-Treatment vWF Concentration (mU/mL) | 553.23 (224.74) | 538.06 (246.07) | 653.55 (246.01) | 0.2312 |
| Post-Treatment vWF Concentration (mU/mL) | 2098.39 (816.75) | 2123.11 (1168.85) | 2261.09 (960.44) | 0.8478 |

LAR: leptin-to-adiponectin ratio; vWF: von Willebrand factor.

3.7. Association between Endothelial Markers and Post-Treatment LAR Values

The pre-treatment and post-treatment concentrations of sE-selectin, sP-selectin, and vWF were then tested against the post-treatment value of the LAR in the statistical analysis (Table 7). We divided the breast cancer patients into three subgroups based on post-treatment LAR values: low (<0.60), moderate (0.60 – 1.04), and high (>1.04). With a trend towards statistical significance, the higher the post-treatment LAR level in breast cancer patients, the higher the pre-treatment sP-selectin as a result ($p = 0.0528$).

Table 7. Endothelial markers according to post-treatment LAR values.

| | Post-Treatment LAR Low Value (<0.60) <i>n</i> = 25 | Post-Treatment LAR Moderate Value (0.60–1.04) <i>n</i> = 19 | Post-Treatment LAR High Value (>1.04) <i>n</i> = 26 | <i>p</i> -Value |
|--|---|--|--|-----------------|
| Pre-Treatment sE-selectin Concentration (ng/mL) | 32.38 25.67/47.30 | 38.76 28.76/45.64 | 32.5 25.25/39.96 | 0.4678 |
| Post-Treatment sE-selectin Concentration (ng/mL) | 137.19 (64.26) | 153.89 (58.67) | 155.77 (56.28) | 0.5101 |
| Pre-Treatment sP-selectin Concentration (ng/mL) | 242.35 158.35/318.00 | 249.38 194.03/310.78 | 327.95 237.75/380.35 | <u>0.0528</u> |
| Post-Treatment sP-selectin Concentration (ng/mL) | 1597.57 986.10/2500.01 | 2097.78 1513.27/2444.38 | 1687.86 1224.87/2550.92 | 0.6921 |
| Pre-Treatment vWF Concentration (mU/mL) | 673.95 461.00/773.35 | 500 400.00/647.90 | 569.9 382.10/811.80 | 0.1947 |
| Post-Treatment vWF Concentration (mU/mL) | 2456.8 1532.14/3178.53 | 2101.08 1581.64/2617.41 | 2148.9 1449.11/2949.19 | 0.8757 |

Underlined *p*-value represent closeness to statistical significance; LAR: leptin-to-adiponectin ratio; vWF: von Willebrand factor.

3.8. Correlation Analysis of Clinical Parameters before and after Treatment

Figure 2 shows the correlation analysis that was performed to find the relationship between LAR and endothelial markers before and after treatment. The analysis was performed using Spearman’s rank correlation and is presented in the form of heatmap. As a result, the pre-treatment markers (sP-selectin, sE-selectin, and LAR) were found to correlate positively with their post-treatment counterparts ($r = 0.4062$, $r = 0.3735$ and 0.4748 , respectively), apart from vWF concentrations before and after treatment.

| | Post-Treatment sP-selectin concentration ng/mL | Post-Treatment sE-selectin concentration ng/mL | Post-Treatment LAR value | Post-Treatment vWF concentration mU/mL |
|---|--|--|--------------------------|--|
| Pre-Treatment sP-selectin concentration ng/mL | 0.4062 | 0.1844 | 0.1719 | 0.0558 |
| Pre-Treatment sE-selectin concentration ng/mL | -0.1828 | 0.3735 | 0.0242 | -0.1205 |
| Pre-Treatment LAR value | -0.0165 | 0.179 | 0.4748 | 0.0723 |
| Pre-Treatment vWF concentration mU/mL | -0.0165 | -0.2007 | -0.0938 | 0.0345 |



Figure 2. Heatmap displaying the *r* values obtained from Spearman’s correlation analysis performed among investigated markers; *p*-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold.

3.9. Association of the Analysed Parameters with DFS in Linear Regression

The next step in the statistical analysis (Table 8) was to determine the associations of pre- and post-treatment LAR and endothelial markers and DFS by multiple linear regression. A higher risk of breast cancer relapse was associated with a lower post-treatment sP-selectin concentration (Beta = -0.2576 , $p = 0.0504$) detected by linear regression (Model 3). Similarly, in Model 4, adjusted for age, BMI, parity, menopausal status, smoking status, tumor stage, tumor diameter, intrinsic type, histological type, and nodal involvement, the outcome demonstrated

a tendency towards significance, with a higher risk of breast cancer relapse associated with a lower post-treatment sP-selectin concentration (Beta = -0.2437 , $p = 0.0583$).

Table 8. Linear regression models for disease-free survival predictors in breast cancer patients.

| | | Model 1 | Model 2 | Model 3 | Model 4 |
|--|-----------------|---------|---------|---------------|---------------|
| Pre-Treatment LAR value | Beta | 0.0374 | −0.0181 | −0.0202 | −0.0009 |
| | <i>p</i> -value | 0.7656 | 0.9144 | 0.9042 | 0.9949 |
| Post-Treatment LAR value | Beta | −0.0331 | −0.0831 | 0.0073 | −0.0835 |
| | <i>p</i> -value | 0.7972 | 0.5616 | 0.9602 | 0.5151 |
| Pre-Treatment sE-selectin Concentration (ng/mL) | Beta | 0.0839 | 0.054 | 0.1127 | 0.0619 |
| | <i>p</i> -value | 0.5023 | 0.6929 | 0.4046 | 0.6048 |
| Post-Treatment sE-selectin Concentration (ng/mL) | Beta | 0.0748 | 0.0539 | 0.0283 | 0.0742 |
| | <i>p</i> -value | 0.5627 | 0.6864 | 0.8324 | 0.5313 |
| Pre-Treatment sP-selectin Concentration (ng/mL) | Beta | 0.0213 | 0.0525 | 0.0306 | 0.0171 |
| | <i>p</i> -value | 0.8635 | 0.6928 | 0.8187 | 0.8831 |
| Post-Treatment sP-selectin Concentration (ng/mL) | Beta | −0.1619 | −0.1566 | −0.2576 | −0.2437 |
| | <i>p</i> -value | 0.2076 | 0.2357 | <u>0.0504</u> | <u>0.0583</u> |
| Pre-Treatment vWF Concentration (mU/mL) | Beta | 0.1682 | 0.1496 | 0.1186 | 0.0641 |
| | <i>p</i> -value | 0.1651 | 0.2377 | 0.3519 | 0.5632 |
| Post-Treatment vWF Concentration (mU/mL) | Beta | −0.0292 | −0.0236 | −0.0406 | −0.0551 |
| | <i>p</i> -value | 0.8125 | 0.8519 | 0.7476 | 0.6252 |

Model 1 adjusted for age. Model 2 adjusted for age, BMI, parity, and menopausal status. Model 3 adjusted for age, BMI, parity, menopausal status, and smoking status. Model 4 adjusted for age, BMI, parity, menopausal status, smoking status, tumor stage, tumor diameters, intrinsic type, histological type, and nodal involvement. Underlined *p*-values represent closeness to statistical significance.

3.10. Survival Analysis Regarding Pre- and Post-Treatment LAR and Endothelial Markers

In the statistical analysis, the cut-off point based on the median were determined using the cut-off points from the ROC curve for the LAR and endothelial markers before and after treatment (Tables S2 and S3 in the Supplementary Materials). The cut-off points divided patients into 2 subgroups: those with above and below the cut-off points. During 68.5 months of follow-up we found 10 cancer-related deaths. One patient only relapsed. The relapse rate was 15.71%. Subsequently, we performed Kaplan–Meier curves in order to determine OS and DFS of each group. Those that are not statistically significant were transferred to the Supplementary Materials (pre-treatment LAR value (Figure S1), pre-treatment sE-selectin concentration (Figure S2), post-treatment sE-selectin concentration (Figure S3), post-treatment vWF concentration (Figure S4)).

Subjects with pre-treatment sP-selectin levels less than 265.05 ng/mL had a significantly better DFS than patients with pre-treatment sP-selectin levels greater than 265.05 ng/mL according to median value cut-off ($p = 0.0365$) (Figure 3B). Additionally, patients with pre-treatment sP-selectin levels below 247.40 ng/mL (ROC cut-off) had a better OS (with a tendency to significance $p = 0.0607$) and DFS than patients with pre-treatment sP-selectin levels above 247.40 ng/mL ($p = 0.0241$) (Figure 3C,D).

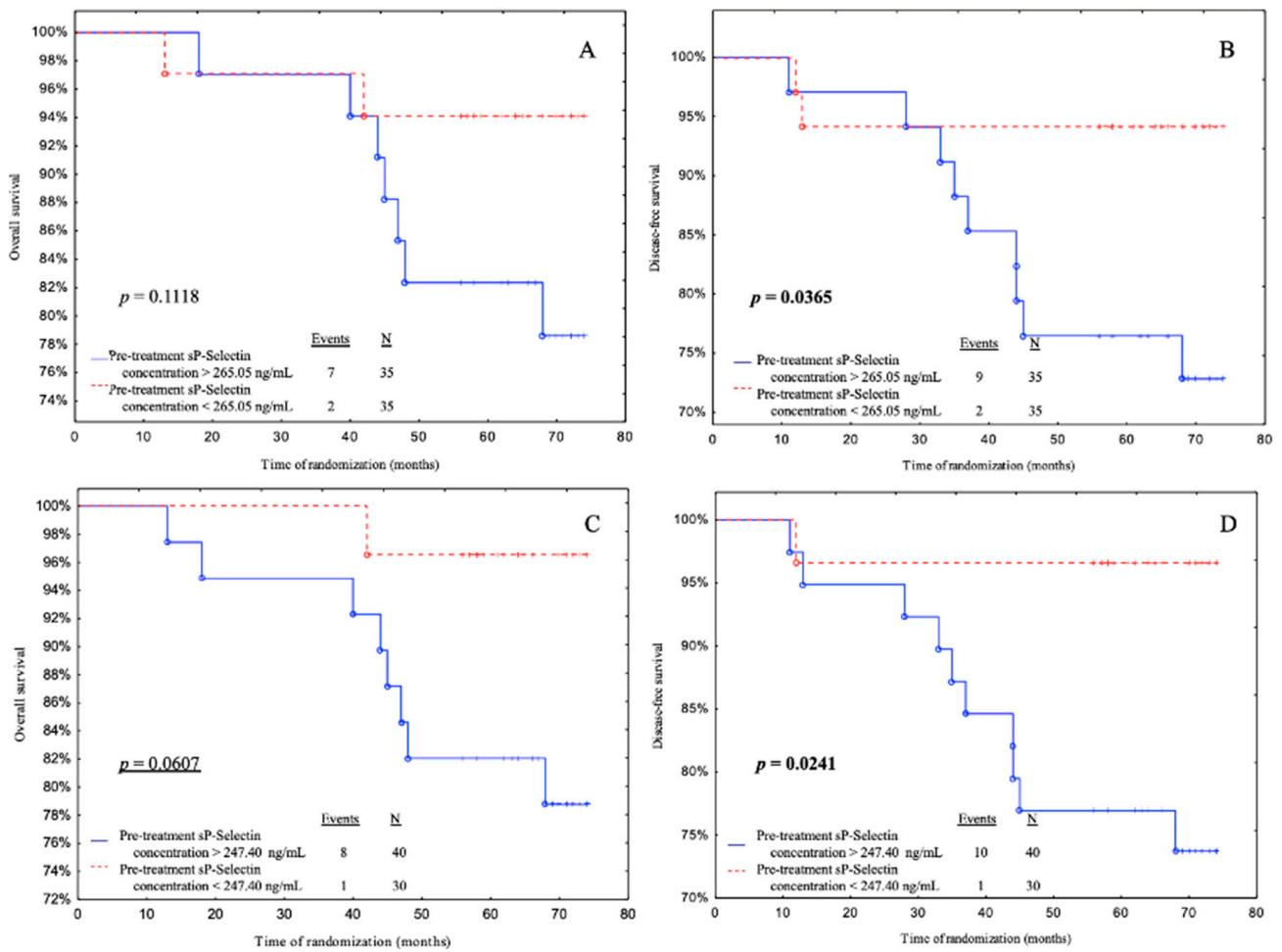


Figure 3. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) for pre-treatment sP-selectin concentrations in cohort. Kaplan–Meier plots illustrating patients survival based on the OS and DFS regarding (A,B) median value cut-off and (C,D) ROC cut-off. p -values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold, underlined p -values represent closeness to statistical significance.

Subjects with pre-treatment vWF levels above 600.00 mU/mL (ROC cut-off) had a significantly better DFS than patients with pre-treatment vWF levels below 600.00 mU/mL with a tendency to significance ($p = 0.0611$) (Figure 4D).

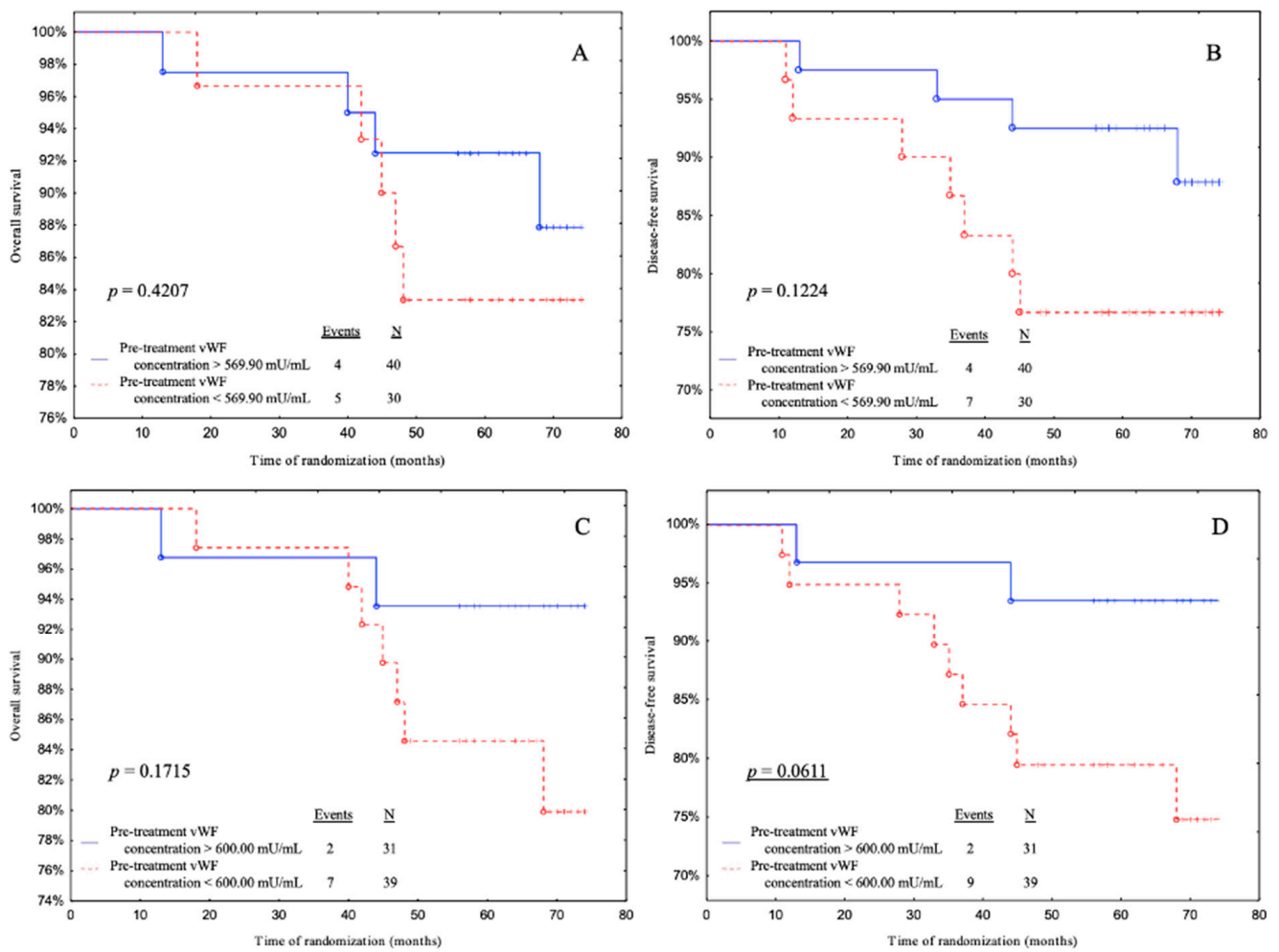


Figure 4. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) for pre-treatment vWF concentrations in cohort. Kaplan–Meier plots illustrating patients survival based on the OS and DFS regarding (A,B) median value cut-off and (C,D) ROC cut-off. Underlined p -values represent closeness to statistical significance.

Subjects with post-treatment LAR levels below 0.82 had a significantly better OS and DFS than patients with post-treatment LAR levels above 0.82 according to median cut-off ($p = 0.0145$, $p = 0.0287$, respectively) (Figure 5A,B). Additionally, patients with post-treatment LAR levels below 0.83 had a better OS and DFS than patients with post-treatment LAR levels above 0.83 according to the ROC cut-off ($p = 0.0145$, $p = 0.0287$, respectively) (Figure 5C,D).

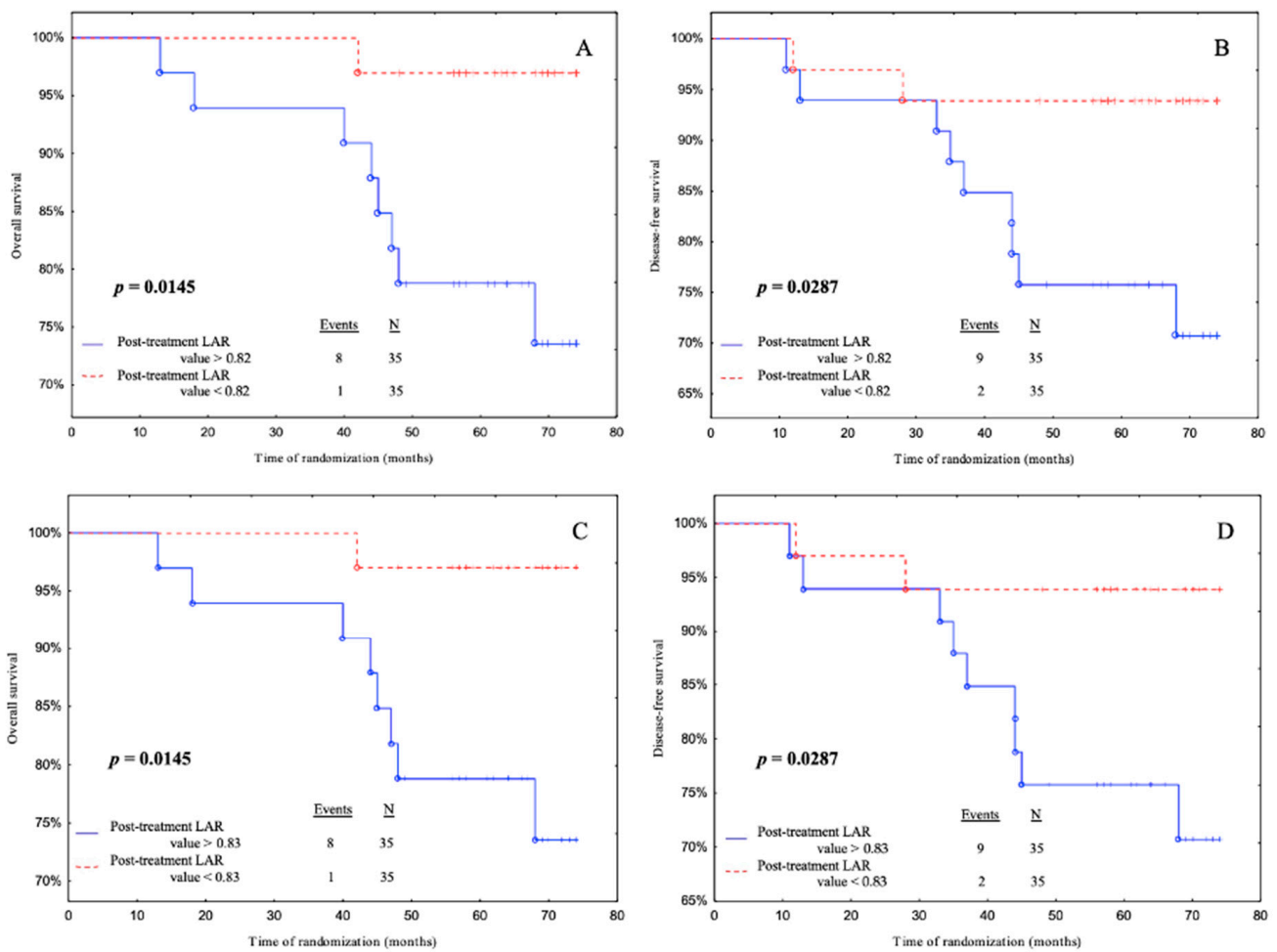


Figure 5. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) for post-treatment LAR values in cohort. Kaplan–Meier plots illustrating patients survival based on the OS and DFS regarding (A,B) median value cut-off and (C,D) ROC cut-off. *p*-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance and are marked in bold, underlined *p*-values represent closeness to statistical significance.

Subjects with post-treatment sP-selectin levels above 2224.44 ng/mL (ROC cut-off) had a significantly better DFS than patients with post-treatment sP-selectin levels below 2224.44 ng/mL with a tendency to significance (*p* = 0.0963) (Figure 6D).

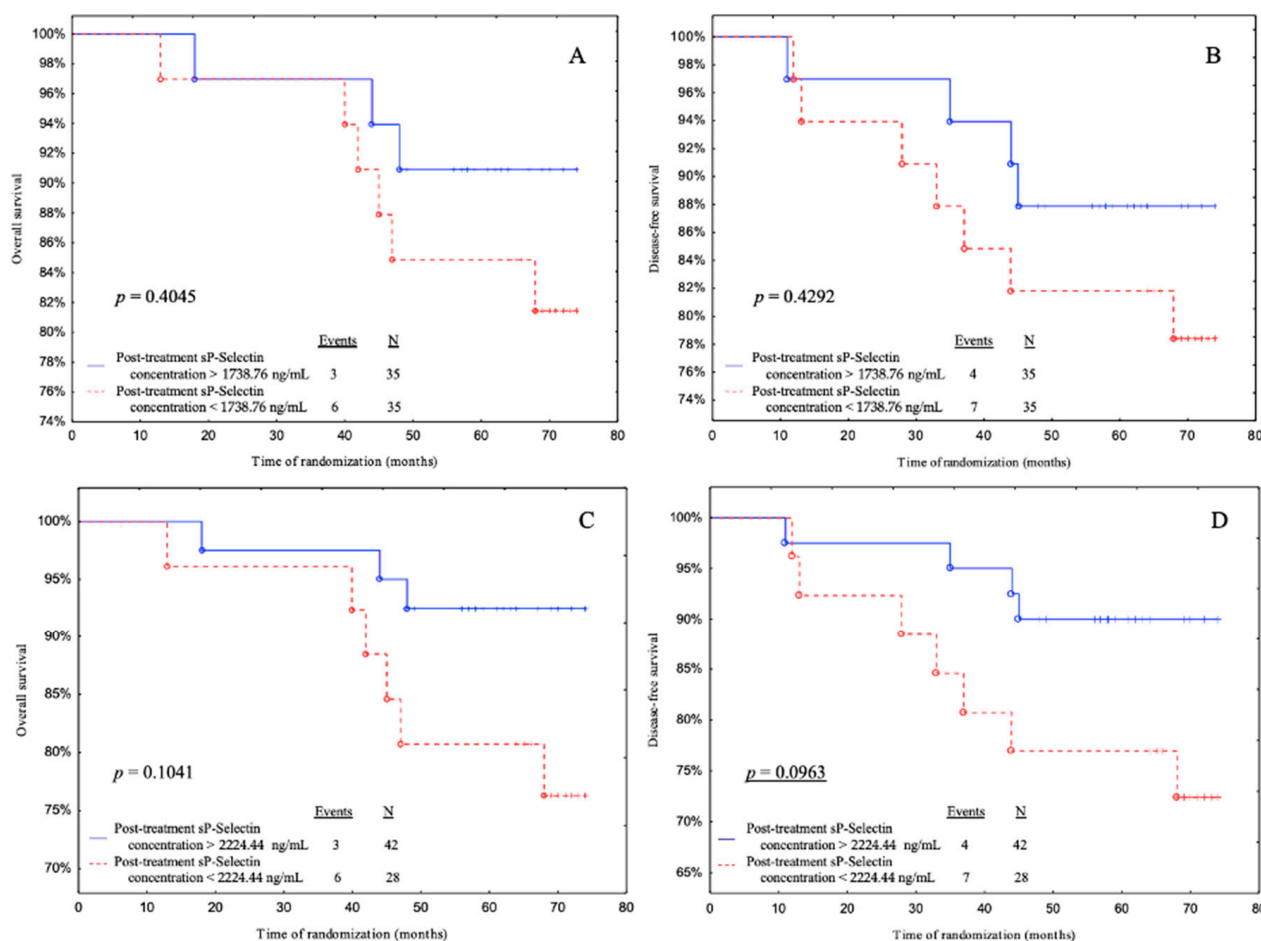


Figure 6. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) for post-treatment sP-selectin concentrations in cohort. Kaplan–Meier plots illustrating patients survival based on the OS and DFS regarding (A,B) median value cut-off and (C,D) ROC cut-off. Underlined p -values represent closeness to statistical significance.

3.11. Univariate and Multivariate Cox Proportional Hazards Regression Models Applied to Determine Prognostic Values of Tested Parameters

The results of hazard ratio and confidence interval were provided by Cox univariate and multivariate regression models are shown in Table 9. BMI, age at diagnosis, smoking status, tumor stage, intrinsic type, histological type, nodal involvement, and tumor diameter were among the prognostic characteristics that were considered when creating the multivariate Cox regression model.

In the adjusted logistic regression analysis reporting an increase in the risk of disease relapse with an increase in the pre-treatment LAR value according to the median, also post-treatment LAR value according to both cut-off points ($p = 0.0371$; $p = 0.0274$, respectively) for DFS demonstrated prognostic values. According to the cut-off point from the ROC curve a higher post-treatment vWF concentration was associated with increase in the risk of relapse ($p = 0.0681$). However, the concentration of pre-treatment sE-selectin and vWF concentration with ROC cut-off indicated opposite associations for DFS ($p = 0.0334$; $p = 0.0880$, respectively).

The univariate Cox regression model confirmed similar associations as in multivariate analysis in respect to post-treatment LAR value and pre-treatment vWF concentration for both cases according to ROC cut-off points. In addition, as the pre-treatment sP-selectin concentration increased there was an increase in the risk of disease recurrence ($p = 0.0555$; $p = 0.0543$, respectively).

Table 9. Disease-free survival probability estimated by multivariate and univariate Cox regression models.

| Variable | Multivariate | | Univariate | | |
|---|--------------------|------------------------|---------------|----------------------|---------------|
| | HR (95% CI) | <i>p</i> -Value | HR (95% CI) | <i>p</i> -Value | |
| Pre-Treatment LAR valueLowHigh | Medians | 11.32 (1.16–110.81) | 0.0371 | 1.09 (0.33–3.58) | 0.8838 |
| | ROC cut-off points | 2.28 (0.28–18.80) | 0.4423 | 1.11 (0.33–3.81) | 0.8643 |
| Post-Treatment LAR valueLowHigh | Medians | 10.32 (1.30–82.12) | 0.0274 | 4.7 (1.02–21.78) | 0.0477 |
| | ROC cut-off points | 10.32 (1.30–82.12) | 0.0274 | 4.7 (1.02–21.78) | 0.0477 |
| Pre-Treatment sE-Selectin ConcentrationLowHigh | Medians | 0.52 (0.12–2.33) | 0.3958 | 0.55 (0.16–1.87) | 0.3377 |
| | ROC cut-off points | 0.18 (0.04–0.88) | 0.0334 | 0.39 (0.12–1.35) | 0.1376 |
| Post-Treatment sE-Selectin ConcentrationLowHigh | Medians | 0.99 (0.25–3.87) | 0.9849 | 0.81 (0.25–2.65) | 0.7233 |
| | ROC cut-off points | 0.99 (0.25–3.87) | 0.9849 | 0.81 (0.25–2.65) | 0.7233 |
| Pre-Treatment sP-Selectin ConcentrationLowHigh | Medians | 3.31 (0.57–19.10) | 0.1808 | 4.48 (0.97–20.82) | <u>0.0555</u> |
| | ROC cut-off points | 5.92 (0.64–54.48) | 0.1162 | 7.55 (0.96–59.19) | <u>0.0543</u> |
| Post-Treatment sP-Selectin ConcentrationLowHigh | Medians | 0.58 (0.09–3.65) | 0.5649 | 1.66 (0.47–5.77) | 0.4257 |
| | ROC cut-off points | 2.81 (0.59–13.41) | 0.1948 | 2.75 (0.80–9.48) | 0.1081 |
| Pre-Treatment vWF ConcentrationLowHigh | Medians | 0.43 (0.11–1.62) | 0.2115 | 0.39 (0.11–1.34) | 0.1343 |
| | ROC cut-off points | 0.22 (0.04–1.26) | <u>0.088</u> | 0.26 (0.06–1.20) | <u>0.0841</u> |
| Post-Treatment vWF ConcentrationLowHigh | Medians | 2.58 (0.51–13.17) | 0.2546 | 1.82 (0.53–6.22) | 0.3396 |
| | ROC cut-off points | 6.26 (0.87–44.94) | <u>0.0681</u> | 2.16 (0.66–7.09) | 0.2029 |

Multivariate analyses were adjusted to BMI, age at the time of diagnosis, smoking status, staging, molecular type, histological type, nodal metastasis, and tumor size; significant values are presented by bold *p*-values, underlined *p*-values represent closeness to significance.

4. Discussion

Breast cancer poses a danger to the health of women worldwide. In 2020, there were approximately 2.26 million new cases and 680,000 new deaths from breast cancer worldwide [27]. Metastasis is a highly complex process that involves multiple cellular mechanisms such as tumor division, invasion, immune evasion, and tissue microenvironment regulation [28]. Despite recent advances in medicine, metastasis is still the leading cause of death in breast cancer patients [29].

4.1. Endothelial Markers before and after Treatment Depending on the Type of Treatment

In the first stage of our study, we compared endothelial markers with different types of treatment. In our investigation, the LAR value increased after treatment despite the treatment pattern. Spearman's correlation analysis confirms that the pre-treatment LAR value correlates positively with their post-treatment substitute. Our results seem to support

those of Słomian et al. who noted in patients with ovarian cancer increased LAR level after chemotherapy. Authors suggest that the LAR may serve as a predictor of the therapeutic response on anticancer drugs [25]. Sun et al. who observed a raised concentration of leptin and adiponectin in the bone marrow of patients with acute leukemia after treatment with dexamethasone. They reasoned that hypothalamic leptin resistance should be considered in obese patients with acute lymphocytic leukemia (ALL) [30]. Increased leptin levels or leptin resistance seem to be negative factors because it is believed to have pro-pro-oncogenic, proliferative, pro-angiogenic, pro-mitogenic properties [31]. The excess amount of leptin and suppression of adiponectin are predominantly associated with disease progression or a shorter survival rate [32]. Siemińska et al. found that in the more advanced prostate cancer subgroup, patients had a higher LAR value. Authors suggest that LAR express more specific indicator of adipose tissue impairment than adiponectin and leptin identified separately [33]. Our investigation group consisted of patients with estrogen receptor (ER)-positive cancers (luminal), who may benefit from endocrine therapies. Morad et al. observed a decrease in LAR in postmenopausal women treated by tamoxifen, which is inconsistent with our study. They also noted that the LAR was higher in breast tumors than in the adjacent tissue. Authors claim that estrogen exposure increased extracellular leptin expression and the LAR in vivo [34].

Furthermore, in our research we observed that pre-treatment sE-selectin concentrations were higher in patients with breast-conserving therapy (with a tendency to significance) and treated with non-anthracycline chemotherapy. Kang et al. noted that a higher sE-selectin concentration was related positively with tumor size, grade, stage, molecular subtype, and worse future outcomes in breast cancer patients [35]. Interestingly, post-treatment sE-selectin concentrations were higher regardless of the treatment pattern and in patients not receiving chemotherapy. Ramcharan et al. observed lower sE-selectin level after 3 months in the colorectal cancer patients treated with surgery alone. However, in the group treated by surgery followed by standard chemotherapy they reported lower sE-selectin at 6 months compared with baseline and 3 months. Authors suggest to analyze their results with caution due to limited number of patients in each subgroups. They speculate that it was probably nonspecific response of the endothelium to the different types of treatment [36]. Considering that sE-selectin is involved in leukocyte and cancer cell extravasation, homing, adhesion, proliferation, cellular dormancy, drug resistance, and tumor progression. It is a potentially promising target for suppression of cancer cell spread into distant tissues [37]. According to Muz et al., as a specific E-selectin antagonist, Uproleselan manipulates the tumor microenvironment by suppression extrinsic and adhesion phases of metastasis. Thus, blocking of E-selectin leads to arrest of tumor dissemination. Additionally, Uproleselan pushes cancer cells to the bloodstream, making them more accessible to chemotherapeutic agents [38].

In our study, we also discovered that patients, despite the treatment pattern, had higher post-treatment sP-selectin concentrations. Adjuvant treatment causes platelet activation which leads to prothrombotic activation. This observation is consistent with Mills et al. who showed higher sP-selectin levels after chemotherapy. P-selectin promotes the generation of platelet—tumor cell complexes in the circulation and stimulates extravasated into a distant site. Authors suggest that chemotherapy lead to enhancement of only platelet activation. Inflammation in response to chemotherapeutic agents is predominantly associated with pre-therapeutic inflammation but also potentially to treatment pattern and baseline tumor biology [39]. This statement is confirmed by our study since we have found positive correlations between pre- and post-treatment concentrations of sP- and sE-selectins (Figure 2).

Moreover, in our investigation, we observed that post-treatment vWF concentrations were higher in patients, regardless of treatment pattern, who were treated with anthracycline chemotherapy. The concentration of vWF is higher after adjuvant treatment because it causes vascular endothelial damage and increases its prothrombotic nature. vWF is considered a marker of vascular endothelial cell damage. Our results corroborate the study

by Gil-Bazo et al. who showed increased vWF levels after surgery, which may be due to secondary tissue damage [40]. In their study, Giri et al. observed higher levels of vWF in patients undergoing chemotherapy, which may mean that chemotherapy predisposes patients to develop thrombosis and endothelial dysfunction [41]. Mills et al. also demonstrated a higher vWF concentration after chemotherapy in breast cancer patients. They also link their results with endothelial damage and a higher probability of hypercoagulability state in post-chemotherapy patient [39].

4.2. Endothelial Markers' Relationship with LAR Concentrations before and after Treatment

The next step of the analysis was to demonstrate the relationship between endothelial markers and LAR values. We observed trend towards significance in respect to the higher the post-treatment LAR level and the higher pre-treatment sP-selectin score in breast cancer patients. This may be due to the fact that the higher the LAR, the higher the systemic inflammation. It is well-established that pro-inflammatory state potentiates angiogenic switch and then new vessel network formation and finally tumor cells dissemination [42]. Inflammation has been acknowledged as a 'red flag of all cancer stages'. Since during this process platelets are activated and secrete numerous compounds, including adhesion molecules (i.e., P-selectin, E-selectin, VCAM-1, ICAM-1), pro-angiogenic, pro-mitogenic (vascular endothelial growth factor). This is responsible for increase vessel permeability and subsequently formation of leukocyte-platelet complexes and the migration of leukocytes across the endothelium [43]. There is strong evidence that P-selectin mRNA levels in mice models are up-regulated by pro-inflammatory cytokines, i.e., TNF- α or IL-1 β [44]. Additionally, the soluble form of P-selectin may exhibit proatherogenic and prothrombotic effects. Therefore, it is involved, among other things, in the pathogenesis of thromboembolic complications in breast cancer patients [45]. Ay et al. noted that sP-selectin concentrations were significantly higher among cancer patients with venous thromboembolism (VTE) in respect to their counterparts without VTE [46]. Tumor progression is associated with overexpression of tissue factor the main initiator of coagulation, which is responsible for clotting-dependent induction of angiogenesis [47]. Thus, in metastatic tumor nature both angiogenesis and TF-dependent coagulation processes collaborate as perfect match 'soulmates'.

4.3. Regression Model Analysis of Research Variables as Prognostic Indicators

The following stage of analysis was to test the regression model analysis of the variables as predictors. We performed a linear regression in which the lower post-treatment sP-selectin concentration was correlated with a shorter DFS with a tendency to significance in Model 3, which was adjusted for age, BMI, parity, menopausal status, and smoking status. Likewise, when age, BMI, parity, menopausal status, smoking status, tumor stage, tumor diameter, intrinsic type, histological type, and nodal involvement were all controlled for, the outcome showed a trend towards significance, with a shorter DFS associated with a lower post-treatment sP-selectin concentration. Furthermore, we produced ROC and Kaplan–Meier curves as an additional analysis. We showed that the post-treatment sP-selectin concentration based on the cut-off point according to the ROC curve is a predictor of breast cancer risk in DFS (a result with a trend towards statistical significance) and confirms the result we obtained by performing a linear regression. Furthermore, in our ROC and Kaplan–Meier analysis, we demonstrated that the higher the sP-selectin concentration before treatment, the worse the prognosis. These findings were supported by the Cox regression model, since patients with a pre-treatment sP-selectin higher than 265.05 ng/mL or 247.40 ng/mL (both cut-off points) demonstrate 4.48- and 7.55-fold higher risk of disease recurrence, respectively. Our findings are in line with Ferroni et al., who noted that pre-surgical high sP-selectin might serve as a prognostic marker in the management as well as in predicting recurrence and mortality in colorectal cancer patients [48]. Additionally, Ay et al. suggest that a high sP-selectin concentration is a predictive factor for cancer-dependent VTE [46]. Graf et al. claim that sP-selectin in tumor microenvironment increases platelet mobilization and may

provoke cancer progression and metastases. Generally, a high concentration of sP-selectin at cancer diagnosis is associated with more advanced and metastatic tumors [49]. It is worth to emphasize that high pre-treatment levels of sP-selectin prognosticate poorly while its elevated post-treatment levels indicate better future outcomes. There is a lack of data analyzing the prognostic value of post-treatment sP-selectin levels. Therefore, it is difficult to define the cause of this condition, this observation should be confirmed by larger study.

Analyzing sE-selectin in this regard, it showed prognostic value only in Cox regression analysis. Surprisingly, subjects with a pre-treatment sE-selectin concentration lower than 25.04 ng/mL appear to have a higher risk of disease recurrence. However, this observation is inconsistent with previous studies of Ramcharan et al., Mann et al. and Muz et al. [36–38]. Since, we should expect opposite results due to the fact that high sE-selectin concentration is associated with a shorter survival rate [50]. Apparently, a low pre-treatment concentration of sE-selectin as a negative biomarker of future outcomes may surprise, but in tumor biology is so many aspects still uncovered, which require further elucidation.

We also conclude that the post-treatment LAR concentration according to the median and cut-off point of the ROC curve is a predictor of breast cancer risk in OS and DFS. ROC curves were used for additional analysis (median and ROC cut-off, respectively) have a 10.32-fold higher risk of disease relapse. This study's findings revealed that the post-treatment LAR was the best predictor of disease relapse. We also performed Kaplan–Meier curves in which we found that patients with higher LAR levels had worse OS and DFS. Additionally, according to a multivariate and univariate Cox regression model, we showed an increase in the risk of disease relapse with an increase in the post-treatment LAR concentration. Thus, subjects with a pre-treatment LAR concentration higher than 0.46 appear to have a 11.32-fold higher risk of disease recurrence; also, patients with post-treatment LAR concentrations higher than 0.82 and 0.83. Diaz et al. hypothesized in their study that the LAR has an impact on the survival of patients with epithelial ovarian cancer. They performed a Kaplan–Meier survival analysis in which women with a low LAR showed a statistically longer disease-specific survival (57 months) compared to those with a median or high level. However, when they performed a Cox regression analysis, the LAR did not prove to be a statistically significant prognostic factor [51]. Similarly, Słomian et al. demonstrated a significant correlation between the LAR (before treatment) and the effects of treatment, i.e., the lower the ratio, the better the clinical response [25].

Furthermore, a lower pre-treatment vWF concentration is a predictor of a high risk of breast cancer recurrence. This result is confirmed by the Kaplan–Meier curves and multivariate and univariate Cox regression. Terraube et al. achieved similar results in their investigation examining whether vWF is involved in metastatic development. They discovered a substantial increase in the frequency of lung metastatic foci in vWF-null mice compared to wild-type mice in an experimental model. They discovered that greater metastasis was caused by higher survival of tumor cells in the lung during the first 24 h in the absence of vWF [52]. Tigges et al. suggest that low vWF amount can drive the development of new blood vessels around the tumor [53]. However, there are conflicting results since Pepin et al. suggest that high vWF concentration is associated with cancer cell spread [54], which may confirm our results related to a negative prognostic value of a post-treatment vWF concentration. Since patients with higher than 2621.25 mU/mL post-treatment vWF levels present a 6.26-fold higher risk of disease recurrence.

4.4. Limitations of This Study

We would like to highlight some of this study's limitations. We enrolled a small number of patients and recruited them from only one study center, which itself limits the number of patients. The sample size was determined by obtaining patients' permission to participate and having them meet very strict inclusion criteria. Additionally, the low ethnic diversity among patients might be associated with limited ability to applicate our results to other ethnic population. Similar study in multicenter mode should be designed in order to reach a larger population that enroll most existing races and conditions. As we recruited

non-metastatic, I–II stage IBrC patients, we are unable to provide the prognostic value for larger and more advanced tumors.

5. Conclusions

Despite the small number of luminal IBrC patients included in this study, our findings reveal a few key points: (1) Regardless of treatment pattern, adjuvant IBrC therapy most likely boosted the LAR and endothelial marker concentrations. (2) Thus, post-treatment endothelial markers are predominantly associated with its pre-therapeutic values but also potentially with treatment pattern and baseline tumor characteristics. (3) The post-treatment LAR levels appear to have been associated with future outcomes in patients with luminal IBrC, as LAR levels higher than 0.82 (median cut-off) and 0.83 (ROC cut-off) have been shown to promote the probability of relapse and mortality in the IBrC cohort. (4) The pre-treatment sP-selectin levels appear to be related to future outcomes in patients with luminal IBrC, with LAR levels more than 265.05 ng/mL (median cut-off) and 247.40 ng/mL (ROC cut-off) increasing the likelihood of recurrence and death in the IBrC cohort. (5) Based on the four linear regression models only the pre-treatment sP-selectin levels showed prognostic value. (6) Higher pre-treatment sP-selectin and post-treatment LAR levels were mainly associated with poorer future outcomes for patients with luminal IBrC.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines11082246/s1>, Figure S1: Kaplan-Meier curves for the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) analysis regarding (A,B) pre-treatment LAR value according to median value cut-off; (C,D) pre-treatment LAR concentration according to ROC cut-off; Figure S2: Kaplan-Meier curves for the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) analysis regarding (A,B) pre-treatment sE-selectin concentration according to median value cut-off; (C,D) pre-treatment sE-selectin concentration according to ROC cut-off; Figure S3: Kaplan-Meier curves for the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) analysis regarding (A,B) post-treatment sE-selectin concentration according to median value cut-off; (C,D) post-treatment sE-selectin concentration according to ROC cut-off; Figure S4: Kaplan-Meier curves for the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) analysis regarding (A,B) post-treatment vWF concentration according to median value cut-off; (C,D) post-treatment vWF concentration according to ROC cut-off; Table S1: Predictive accuracy results for LAR and endothelial markers before treatment; Table S2: Calculated median and ROC cut-off point values of investigated parameters before treatment; Table S3: Predictive accuracy results for LAR and selectins after treatment; Table S4: Calculated median and ROC cut-off point values of investigated parameters after treatment.

Author Contributions: Conceptualization, B.R.-C. and K.K.; methodology, B.R.-C., K.K. and P.K.; software, K.K.; validation, K.K., B.R.-C. and D.F.; formal analysis, K.K.; investigation, K.K. and B.R.-C.; resources, B.R.-C. and P.R.; data curation, B.R.-C. and P.R.; writing—original draft, K.K. and B.R.-C.; writing—review and editing, B.R.-C.; visualization, K.K. and D.F.; supervision, B.R.-C.; project administration, B.R.-C. and P.R.; funding acquisition, B.R.-C. and P.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

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 this study.

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

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

Acknowledgments: We would like to thank all 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. van Denderen, B.J.; Thompson, E.W. Cancer: The to and fro of tumour spread. *Nature* **2013**, *493*, 487–488. [[PubMed](#)]
2. Xu, B.; Hu, X.; Feng, J.; Geng, C.; Jin, F.; Li, H.; Li, M.; Li, Q.; Liao, N.; Liu, D.; et al. Chinese expert consensus on the clinical diagnosis and treatment of advanced breast cancer (2018). *Cancer* **2020**, *126*, 3867–3882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. O'Shaughnessy, J. Extending Survival with Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer. *Oncologist* **2005**, *10*, 20–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jin, X.; Mu, P. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer* **2015**, *9* (Suppl. S1), 23–34. [[PubMed](#)]
5. Guo, Y.; Arciero, C.A.; Jiang, R.; Behera, M.; Peng, L.; Li, X. Different Breast Cancer Subtypes Show Different Metastatic Patterns: A Study from A Large Public Database. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2020**, *21*, 3587–3593. [[CrossRef](#)]
6. 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](#)]
7. Agostinis-Sobrinho, C.; Vicente, S.E.C.F.; Norkiene, S.; Rauckienė-Michaelsson, A.; Kievisienė, J.; Dubey, V.P.; Razbadauskas, A.; Lopes, L.; Santos, R. Is the Leptin/Adiponectin Ratio a Better Diagnostic Biomarker for Insulin Resistance than Leptin or Adiponectin Alone in Adolescents? *Children* **2022**, *9*, 1193. [[CrossRef](#)]
8. Borsig, L.; Laubli, H. Cell Adhesion during Tumorigenesis and Metastasis. In *Encyclopedia of Cancer*, 3rd ed.; Boffetta, P., Hainaut, P., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 307–314.
9. Drnasfield, I.; Stocks, S.C.; Haslett, C. Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* **1995**, *85*, 3264–3273. [[CrossRef](#)]
10. Abdal Dayem, A.; Lee, S.; Ychoi, H.; Cho, S.G. The Impact of Adhesion Molecules on the In Vitro Culture and Differentiation of Stem Cells. *Biotechnol. J.* **2018**, *13*, 1700575.
11. Ley, K. Functions of selectins. In *Mammalian Carbohydrate Recognition System*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2001; Volume 33, pp. 177–200. [[CrossRef](#)]
12. Tinoco, R.; Otero, D.C.; Takahashi, A.A.; Bradley, L.M. PSGL-1: A new player in the immune checkpoint landscape. *Trends Immunol.* **2017**, *38*, 323–335. [[CrossRef](#)]
13. Alves, C.S.; Burdick, M.M.; Thomas, S.N.; Pawar, P.; Konstantopoulos, K. The dual role of CD44 as a functional P-selectin ligand and fibrin receptor in colon carcinoma cell adhesion. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2008**, *294*, C907–C916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mannori, G.; Crottet, P.; Cecconi, O.; Hanasaki, K.; Aruffo, A.; Nelson, R.M.; Varki, A.; Bevilacqua, M.P. Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: Role of mucin-type glycoproteins. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4425–4431. [[PubMed](#)]
15. Gout, S.; Morin, C.; Houle, F.; Huot, J. Death receptor-3, a new E-Selectin counter-receptor that confers migration and survival advantages to colon carcinoma cells by triggering p38 and ERK MAPK activation. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9117–9124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Schrijver, I.T.; Kemperman, H.; Roest, M.; Kesecioglu, J.; de Lange, D.W. Soluble P-selectin as a Biomarker for Infection and Survival in Patients with a Systemic Inflammatory Response Syndrome on the Intensive Care Unit. *Biomark. Insights* **2017**, *12*, 1177271916684823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Pang, J.H.; Coupland, L.A.; Freeman, C.; Chong, B.H.; Parish, C.R. Activation of tumour cell ECM degradation by thrombin-activated platelet membranes: Potentially a P-selectin and GPIIb/IIIa-dependent process. *Clin. Exp. Metastasis* **2015**, *32*, 495–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Coupland, L.A.; Chong, B.H.; Parish, C.R. Platelets and P-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 4662–4671. [[CrossRef](#)]
19. Franchini, M.; Frattini, F.; Crestani, S.; Bonfanti, C.; Lippi, G. von Willebrand factor and cancer: A renewed interest. *Thromb. Res.* **2013**, *13*, 290–292. [[CrossRef](#)]
20. Dhami, S.P.S.; Patmore, S.; Comerford, C.; Byrne, C.M.; Cavanagh, B.; Castle, J.; Kirwan, C.C.; Kenny, M.; Schoen, I.; O'Donnell, J.S.; et al. Breast cancer cells mediate endothelial cell activation, promoting von Willebrand factor release, tumor adhesion, and transendothelial migration. *J. Thromb. Haemost.* **2022**, *20*, 2350–2365. [[CrossRef](#)]
21. Rhone, P.; Zarychta, E.; Bielawski, K.; Ruzkowska-Ciastek, B. Pre-surgical level of von Willebrand factor as an evident indicator of breast cancer recurrence. *Cancer Biomark.* **2020**, *29*, 359–372. [[CrossRef](#)]
22. Nalabolu, M.R.; Palasamudram, K.; Jamil, K. Adiponectin and leptin molecular actions and clinical significance in breast cancer. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* **2014**, *8*, 31–40.
23. Dal Maso, L.; Augustin, L.S.; Karalis, A.; Talamini, R.; Franceschi, S.; Trichopoulos, D.; Mantzoros, C.S.; La Vecchia, C. Circulating adiponectin and endometrial cancer risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 1160–1163.
24. Goktas, S.; Yilmaz, M.I.; Caglar, K.; Sonmez, A.; Kilic, S.; Bedir, S. Prostate cancer and adiponectin. *Urology* **2005**, *65*, 1168–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Słomian, G.J.; Nowak, D.; Buczkowska, M.; Głogowska-Gruszka, A.; Słomian, S.P.; Rocznik, W.; Janyga, S.; Nowak, P. The role of adiponectin and leptin in the treatment of ovarian cancer patients. *Endokrynol. Pol.* **2019**, *70*, 57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Iwan-Zietek, I.; Ruzkowska-Ciastek, B.; Michalska, M.; Overskaug, E.; Goralczyk, K.; Dabrowiecki, S.; Róść, D. Association of adiponectin and leptin-to-adiponectin ratio with the function of platelets in morbidly obese patients. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **2016**, *67*, 555–561.

27. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Williams, E.D.; Gao, D.; Redfern, A.; Thompson, E.W. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 716–732. [[CrossRef](#)]
29. Park, M.; Kim, D.; Ko, S.; Kim, A.; Mo, K.; Yoon, H. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6806. [[CrossRef](#)]
30. Sun, J.; Zhang, R.; Tang, J.; Wu, X.; Zhu, L.; Huang, H.; Chen, H.; Xiao, M.; Luo, H.; Zheng, H.; et al. Prognostic Observational Analysis of BMI, Leptin, and Adiponectin in Children With Acute Lymphocytic Leukemia Undergoing Remission-Induction Chemotherapy. *Front. Pediatr.* **2022**, *10*, 797836. [[CrossRef](#)]
31. 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.
32. 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.
33. Siemińska, L.; Borowski, A.; Marek, B.; Nowak, M.; Kajdaniuk, D.; Warakowski, J.; Kos-Kudła, B. Serum concentrations of adipokines in men with prostate cancer and benign prostate hyperplasia. *Endokrynol. Pol.* **2018**, *69*, 120–127.
34. Morad, V.; Abrahamsson, A.; Dabrosin, C. Estradiol affects extracellular leptin:adiponectin ratio in human breast tissue in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 3460–3467. [[CrossRef](#)]
35. Kang, S.A.; Blache, C.A.; Bajana, S.; Hasan, N.; Kamal, M.; Morita, Y.; Gupta, V.; Tsolmon, B.; Suh, K.S.; Gorenstein, D.G.; et al. The effect of soluble E-selectin on tumor progression and metastasis. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 331.
36. Ramcharan, K.S.; Lip, G.Y.; Stonelake, P.S.; Blann, A.D. Effect of standard chemotherapy and antiangiogenic therapy on plasma markers and endothelial cells in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 1742–1749. [[CrossRef](#)]
37. Mann, A.P.; Tanaka, T. E-selectin: Its role in cancer and potential as a biomarker. *Transl. Med.* **2011**, *S1*, 002.
38. Muz, B.; Abdelghafer, A.; Markovic, M.; Yavner, J.; Melam, A.; Salama, N.N.; Azab, A.K. Targeting E-selectin to Tackle Cancer Using Uproleselan. *Cancers* **2021**, *13*, 335. [[CrossRef](#)]
39. Mills, P.J.; Ancoli-Israel, S.; Parker, B.; Natarajan, L.; Hong, S.; Jain, S.; Sadler, G.R.; von Känel, R. Predictors of inflammation in response to anthracycline-based chemotherapy for breast cancer. *Brain Behav. Immun.* **2008**, *22*, 98–104. [[CrossRef](#)]
40. Gil-Bazo, I.; Catalán Goni, V.; Alonso Gutiérrez, A.; Rodríguez Rodríguez, J.; Páramo Fernández, J.A.; de la Cámara Gómez, J.; Hernández Lizoain, J.L.; García-Foncillas López, J. Impact of surgery and chemotherapy on von Willebrand factor and vascular endothelial growth factor levels in colorectal cancer. *Clin. Transl. Oncol. Off. Public Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **2005**, *7*, 150–155. [[CrossRef](#)]
41. Giri, S.; Bose, J.C.; Chandrasekar, A.; Tiwary, B.K.; Gajalakshmi, P.; Chatterjee, S. Increased Plasma Nitrite and von Willebrand Factor Indicates Early Diagnosis of Vascular Diseases in Chemotherapy Treated Cancer Patients. *Cardiovasc. Toxicol.* **2019**, *19*, 36–47. [[CrossRef](#)]
42. Liu, J.; Lin, P.C.; Zhou, B.P. Inflammation fuels tumor progress and metastasis. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 3032–3040. [[CrossRef](#)]
43. Mašlanka, K. The role of platelets in inflammatory processes. *J. Transfus. Med.* **2014**, *7*, 102–109.
44. Weller, A.; Isenmann, S.; Vestweber, D. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 15176–15183. [[CrossRef](#)]
45. Woollard, K.J.; Chin-Dusting, J. P-selectin antagonism in inflammatory disease. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 4113–4118. [[CrossRef](#)]
46. Ay, C.; Simanek, R.; Vormittag, R.; Dunkler, D.; Alguel, G.; Koder, S.; Kornek, G.; Marosi, C.; Wagner, O.; Zielinski, C.; et al. High plasma levels of soluble P-selectin are predictive of venous thromboembolism in cancer patients: Results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS). *Blood* **2008**, *112*, 2703–2708. [[CrossRef](#)]
47. den Berg, Y.W.; Osanto, S.; Reitsma, P.H.; Versteeg, H.H. The relationship between tissue factor and cancer progression: Insights from bench and bedside. *Blood* **2012**, *119*, 924–932.
48. Ferroni, P.; Roselli, M.; Martini, F.; D’Alessandro, R.; Mariotti, S.; Basili, S.; Spila, A.; Aloe, S.; Palmirotta, R.; Maggini, A.; et al. Prognostic value of soluble P-selectin levels in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **2004**, *111*, 404–408. [[CrossRef](#)]
49. Graf, M.E.; Sookthai, D.; Johnson, T.; Schübel, R.; González Maldonado, S.; Pletsch-Borba, L.; Katzke, V.; Bugert, P.; Hoffmeister, M.; Kaaks, R.; et al. Pre-diagnostic plasma concentrations of Fibrinogen, sGPIIb/IIIa, sP-selectin, sThrombomodulin, Thrombopoietin in relation to cancer risk: Findings from a large prospective study. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 2659–2667.
50. Alexandrakis, M.G.; Passam, F.H.; Sfiridaki, K.; Kafarakis, P.; Karydi, E.; Liapi, D.; Perisinakis, K.; Kyriakou, D.S. Clinical significance of circulating endothelial adhesion molecules (sE-selectin and sICAM) in untreated multiple myeloma patients. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *349*, 39–43. [[CrossRef](#)]
51. Diaz, E.S.; Karlan, B.Y.; Li, A.J. Obesity-associated adipokines correlate with survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **2013**, *129*, 353–357. [[CrossRef](#)]
52. Terraube, V.; Pendu, R.; Baruch, D.; Gebbink, M.F.; Meyer, D.; Lenting, P.J.; Denis, C.V. Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2006**, *4*, 519–526. [[CrossRef](#)]

53. Tigges, U.; Hyer, E.G.; Scharf, J.; Stallcup, W.B. FGF2-dependent neovascularization of subcutaneous Matrigel plugs is initiated by bone marrow-derived pericytes and macrophages. *Development* **2008**, *35*, 523–532. [[CrossRef](#)]
54. Pépin, M.; Kleinjan, A.; Hajage, D.; Büller, H.R.; Di Nisio, M.; Kamphuisen, P.W.; Salomon, L.; Veyradier, A.; Stepanian, A.; Mahé, I. ADAMTS-13 and von Willebrand factor predict venous thromboembolism in patients with cancer. *J. Thromb. Haemost.* **2016**, *14*, 306–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

V. WNIOSKI

Publikacja nr 1: Evaluation of the prognostic value of fibrinolytic elements in invasive breast carcinoma patients

1. Stężenia t-PA i PAI-1 przed leczeniem mogą służyć zarówno jako markery predykcyjne, jak i prognostyczne we wczesnym stadium raka piersi,
2. Stężenie PAI-1 w osoczu wynoszące 33,91 ng/ml z czułością 90% i swoistością 36% wykazuje najlepszą wartość odcięcia do rozróżnienia zdrowych osób od przypadków raka piersi,
3. Stężenia t-PA wynoszące 5,3 ng/ml przy 66% swoistości i 70% czułości pozwala na rozróżnienie pacjentów z nawrotem choroby i pacjentów bez nawrotu choroby,
4. Stężenia t-PA wyższe niż 5ng/ml związane jest z gorszym rokowaniem i w tej grupie pacjentów doszło do większej ilości nawrotów choroby,
5. Potencjał antyfibrynolityczny wyrażony przez stosunek PAI-1/t-PA niższy niż 7,5 wiąże się z gorszym rokowaniem i krótszym przeżyciem pacjentek.

Publikacja nr 2: High post-treatment leptin concentration as a prognostic biomarker of the high risk of luminal breast cancer relapse: A six-year comprehensive study

1. Zastosowane leczenie u chorych na raka piersi zwiększa stężenie leptyny i adiponektyny, niezależnie od zastosowanego schematu leczenia,
 2. Stężenie leptyny wyższe niż 26,88 ng/ml, (punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC) zwiększa prawdopodobieństwo nawrotu i śmiertelność chorobową w grupie badanej,
 3. Stężenie leptyny przed leczeniem koreluje dodatnio ze stężeniem leptyny i ujemnie z poziomem adiponektyny po leczeniu, zatem przedoperacyjny profil adipokin może odzwierciedlać jego przyszłe zależności,
 4. Jedynie stężenie leptyny po leczeniu wykazywało implikacje prognostyczne, na podstawie modelu regresji liniowej,
 5. Konieczne są dalsze badania w celu ustalenia czy oporność na chemioterapię jest przyczyną podwyższonego stężenia leptyny po leczeniu, zwiększonej częstości nawrotów i śmiertelności u pacjentów z rakiem piersi.
-

Publikacja nr 3: Complex analysis of endothelial markers as potential prognostic indicators in luminal invasive breast carcinoma patients: Outcomes of a six-year observational study

1. Terapia uzupełniająca, niezależnie od zastosowanego schematu leczenia, najprawdopodobniej zwiększa stężenie LAR i markerów śródbłonkowych,
 2. Stężenia markerów aktywacji śródbłonka naczyniowego po leczeniu są dodatnio skorelowane ze stężeniem tych parametrów po leczeniu a także są powiązane z zastosowanym schematem leczenia oraz średnicą guza, stopniem złośliwości histologicznej oraz zajęciem węzłów chłonnych,
 3. Stężenie LAR po leczeniu jest powiązane z przyszłymi wynikami w grupie pacjentek z rakiem piersi, ponieważ wykazano, że stężenie LAR wyższe niż 0,82 (punkt odcięcia na podstawie mediany) i 0,83 (punkt odcięcia z krzywej ROC) zwiększają prawdopodobieństwo nawrotów i śmiertelności w tej grupie,
 4. Stężenie sP-selektyny przed leczeniem wydaje się być powiązane z przyszłymi wynikami u pacjentów z luminalnym rakiem piersi, przy stężeniu LAR powyżej 265,05 ng/ml (punkt odcięcia na podstawie mediany) i 247,40 ng/ml (punkt odcięcia z krzywej ROC) zaobserwowano zwiększenie prawdopodobieństwa nawrotu i śmierci w tej grupie,
 5. Jedynie stężenie sP-selektyny przed leczeniem wykazało wartość prognostyczną w oparciu o cztery modele regresji liniowej,
 6. Wyższe stężenia sP-selektyny przed leczeniem i po leczeniu są związane z gorszym rokowaniem u pacjentów z rakiem piersi.
-

VI. PODSUMOWANIE I OGRANICZENIA BADANIA

Rak piersi, mimo znacznego rozwoju medycyny nadal zbiera ogromne żniwo wśród kobiet. Zalicza się do chorób heterogennych, ponieważ zidentyfikowano kilka jego podtypów, które różnią się przebiegiem klinicznym, leczeniem i rokowaniem dla pacjentek. Stąd, lekarze nieustannie poszukują kolejnych markerów umożliwiających wczesne wykrycie choroby oraz ocenę prawdopodobieństwa wystąpienia przerzutów. Dlatego rak piersi wymaga od naukowców spojrzenia interdyscyplinarnego.

Istnieje wiele dowodów na to, że jednym z czynników predysponujących do zachorowania na raka piersi jest otyłość. Tkanka tłuszczowa, której w oczywisty sposób nadmiar obserwujemy w otyłości produkuje hormony m.in. estrogeny (estron i estriol). Wydłużona ekspozycja na estrogeny, pochodzenia pozajajnikowego, zwłaszcza po menopauzie, zwiększa ryzyko zachorowania na homonozależnego raka piersi. Ponadto, nadmiar tkanki tłuszczowej wywołuje lokalnie występujący stan zapalny poprzez zarówno zwiększenie stężenia leptyny jak i zmniejszenie stężenia adiponektyny, który powoduje przebudowę lokalnego mikrośrodowiska, prowadząc do rozwoju między innymi nowotworów. Aktualnym zagadnieniem jest pojęcie tzw. „mikrośrodowiska guza”, którego elementem są zarówno adipocyty jak i śródbłonek naczyniowy. Interakcja między mikrośrodowiskiem guza a komórkami nowotworowymi prowadzi do proliferacji, namnażania się komórek nowotworowych i powstawania przerzutów.

Ważnym aspektem w przebiegu choroby nowotworowej są powikłania zakrzepowozatorowe, które występują u nawet 15% chorych. Komórki nowotworowe wywołują aktywację komórek śródbłonek naczyniowego, powodując między innymi zwiększone wydzielanie vWF. Ponadto, obserwuje się zaburzenia procesu fibrynolizy, które mogą wpływać na powstanie przerzutów komórek nowotworowych.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że stężenia t-PA i PAI-1, sP-selektyny przed leczeniem oraz stężenie leptyny po leczeniu mogą służyć zarówno jako markery predykcyjne, jak i prognostyczne we wczesnym stadium raka piersi. Ponadto, terapia uzupełniająca, niezależnie od schematu zastosowanego leczenia zwiększyła stężenia markerów produkowanych przez tkankę tłuszczową i śródbłonek naczyniowy. Stwierdzono, że zwiększone stężenie leptyny i LAR po leczeniu zwiększa prawdopodobieństwo nawrotu

i śmiertelność chorobową w kohorcie. Ponadto, zwiększone stężenie sP-selektyny zarówno przed leczeniem jak i po leczeniu jest związane z krótszym czasem wolnym od progresji choroby.

Należy w tym miejscu podkreślić ograniczenia przeprowadzonych badań. Pacjentki były rekrutowane jedynie z jednego ośrodka badawczego, ponadto rekrutacja przebiegała w warunkach rutynowej opieki medycznej. Na wstępie badań zostały określone rygorystyczne kryteria włączenia i wyłączenia co wpłynęło na ograniczoną liczbę pacjentek zakwalifikowanych do grupy badanej. Do badania zostały włączone pacjentki z wczesnym rakiem piersi (stadium IA-IIIB), co mogło ograniczyć stwierdzenie jak analizowane parametry zmieniłyby się w zaawansowanych rakach piersi w stadium IIIB-IV. Ponadto, konieczne są dalsze badania w celu ustalenia czy oporność na chemioterapię jest przyczyną podwyższonego stężenia leptyny po leczeniu, zwiększonej częstości nawrotów i śmiertelności u pacjentek z rakiem piersi.

VII. STRESZCZENIA

Streszczenie w języku polskim

WPROWADZENIE I CEL: Rak piersi należy do najpoważniejszych problemów onkologicznych i stanowi coraz większe wyzwanie społeczne, ekonomiczne oraz zdrowotne na świecie. Dysfunkcja aktywności tkanki tłuszczowej oraz komórek śródbłonka naczyniowego promuje transformację nowotworową, stąd celem pracy była ocena stężeń markerów produkowanych przez komórki śródbłonka (tj. t-PA, PAI-1, rozpuszczalna forma selektyny P, rozpuszczalna forma selektyny E i vWF) oraz tkankę tłuszczową (leptyna, adiponektyna) w grupie pacjentek z pierwotnym, jednostronnym rakiem piersi bez przerzutów odległych. Parametry układu fibrynolizy porównano przed leczeniem u pacjentek chorych oraz u zdrowych ochotników. Pozostałe markery oceniano przed i po zastosowanym leczeniu. Ponadto określono zależności pomiędzy wszystkimi parametrami a wskaźnikami kliniko-patologicznymi oraz rodzajem zastosowanego leczenia. Celem pracy była również ocena wartości rokowniczej tych parametrów w przewidywaniu występowania choroby i jej nawrotów.

MATERIAŁ i METODY: W publikacji nr 1 badaniem objęto 60 kobiet w wieku 41-67 lat (średnia 52,9 lat) z pierwotnym, jednostronnym luminalnym A i B rakiem piersi bez przerzutów odległych (M0) w stadium IA-IIIB. Mediana wielkości guza wynosiła 1,6 cm. U siedemnastu pacjentów (28%) stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych (N1). Odnotowano 42 przypadki w stadium I (70%) i 18 w stadium II (30%) stopnia zaawansowania TNM. W analizie przeżycia wolnego od nawrotów wystąpiło dziesięć zdarzeń, mediana czasu obserwacji wyniosła 33 miesiące (odsetek nawrotów wyniósł 16,7%). Do badania włączono także 45 zdrowych ochotników (przedział wiekowy 44–68 lat) z potwierdzonym w badaniu mammograficznym brakiem raka piersi. W ramach badania w obu grupach oceniono stężenie t-PA, PAI-1 i stosunek t-PA/PAI-1 i PAI-1/t-PA. W publikacji nr 2 i 3 badaniem objęto 70 pacjentek z pierwotnym, jednostronnym luminalnym A i B rakiem piersi bez przerzutów odległych (M0) w stadium IA-IIIB. Mediana wieku wyniosła 54,5 lat, a mediana wielkości guza -1,5 cm. W klasyfikacji raka piersi TNM w stadium T1 było 48 chorych (69%), a w T2 – 22 chorych (31%). Tylko 17 (24%) z 70 pacjentów miało przerzuty do lokalnych węzłów chłonnych. Mediana czasu obserwacji wyniosła 68,5 miesiąca. Podczas tego badania wystąpiło 11

zdarzeń, w tym jeden przerzut odległy i 10 zgonów (częstość nawrotów: 15,71%). **W publikacji 2** oceniono stężenie leptyny i adiponektyny przed i po leczeniu. **W publikacji 3** oceniono stężenie rozpuszczalnych form selektyny P i E, vWF i LAR przed i po leczeniu.

WYNIKI: W wyniku przeprowadzonych analiz statystycznych **w publikacji nr 1** w celu oceny dokładności diagnostycznej elementów układu fibrynolizy skonstruowano krzywe ROC oraz odnotowano, że jedynie dla PAI-1 osiągnięto przydatność diagnostyczną testu. Wyznaczono stężenie PAI-1 w osoczu wynoszące 33,91 ng/ml (czułość 90% i swoistość 36%) jako najlepszą wartość odcięcia do rozróżnienia zdrowych osób od przypadków raka piersi. Następnie przeprowadzono dalszą analizę w celu przewidywania nawrotu choroby. Największą wartość AUC^{ROC} uzyskano dla stężenia t-PA. Punkt odcięcia dla stężenia t-PA ustalono na 5,3 ng/ml (66% swoistości i 70% czułości). Wartość ta pozwala na rozróżnienie pacjentów z nawrotem choroby i bez. Ponadto, na podstawie krzywych przeżycia Kaplana-Meiera wykazano, że pacjenci ze stężeniem t-PA przed leczeniem większym niż 5 ng/ml mają większe prawdopodobieństwo wznowy choroby. Nawrót choroby w tej grupie pacjentów wystąpił u 7 z 28 (25%) osób. **W publikacji nr 2** niezależnie od zastosowanego schematu leczenia stężenie leptyny i adiponektyny wzrosło. Ponadto, wykorzystując analizę korelacji rang Spearmana wykazano, że stężenie leptyny przed leczeniem koreluje dodatnio ze stężeniem leptyny po leczeniu i ujemnie ze stężeniem adiponektyny po leczeniu oraz że stężenie adiponektyny przed leczeniem koreluje dodatnio ze stężeniem adiponektyny po leczeniu. W następnym etapie analizy statystycznej skonstruowano krzywe ROC oraz wykonano analizy przeżycia Kaplana-Meiera. Na podstawie wyników badania stwierdzono, że stężenie leptyny po leczeniu jest najsilniejszym predyktorem nawrotu choroby. Ponadto, uznano, że stężenie leptyny po leczeniu wynoszące 26,88 ng/ml przy czułości 88,9% i swoistości 64,9% jest najlepszą wartością odcięcia pozwalającą na rozróżnienie pacjentów z nawrotem choroby i bez nawrotu wykorzystując do tego maksymalną wartość wskaźnika Youdena. Ostatnim etapem analizy statystycznej było określenie modeli regresji liniowej pomiędzy adipokinami przed i po leczeniu a przeżyciem wolnym od choroby. Niezależnie od skorygowanych czynników wykazały, że wyższe stężenie leptyny po leczeniu było skorelowane z krótszym przeżyciem wolnym od progresji choroby. **W trzeciej publikacji** niezależnie od zastosowanego schematu leczenia LAR i markery śródbłonna naczyniowego wzrosły po leczeniu. Stwierdzono, że markery stosowane przed leczeniem korelują dodatnio z ich odpowiednikami po leczeniu, wykorzystując do tego korelację rang Spearmana. Ponadto, określono powiązania markerów

LAR i śródbłonna naczyniowego przed i po leczeniu oraz przeżycia wolnego od choroby za pomocą regresji liniowej. Wyższe ryzyko nawrotu raka piersi wiązało się z niższym stężeniem sP-selektyny po leczeniu potwierdzonym metodą regresji liniowej. Ponadto, w celu określenia przeżycia całkowitego i czasu wolnego od choroby wykonano krzywe Kaplana-Meiera. Pacjenci ze stężeniem LAR po leczeniu niższym niż 0,82 mieli istotnie lepszy całkowite przeżycie (OS) i przeżycie wolne od choroby (DFS) zgodnie z medianą odcięcia. Ponadto, pacjenci z poziomem LAR po leczeniu poniżej 0,83 wykazywali lepszy OS i DFS niż pacjenci z poziomem LAR po leczeniu powyżej 0,83 zgodnie z punktem odcięcia z krzywej ROC. Pacjenci ze stężeniem sP-selektyny przed leczeniem niższym niż 265,05 ng/ml prezentowali znacznie dłuższy czas wolny od progresji choroby niż pacjenci ze stężeniem sP-selektyny przed leczeniem wyższym niż 265,05 ng/ml, zgodnie z medianą wartości odcięcia. Ponadto, pacjenci ze stężeniem sP-selektyny przed leczeniem poniżej 247,40 ng/ml (punkt odcięcia z krzywej ROC) mieli dłuższy czas wolny od choroby.

WNIOSKI: Stwierdzono, że stężenia t-PA i PAI-1, sP-selektyny przed leczeniem oraz stężenie leptyny po leczeniu mogą służyć zarówno jako markery predykcyjne, jak i prognostyczne we wczesnym stadium raka piersi. Zastosowana terapia uzupełniająca, niezależnie od wybranego schematu leczenia zwiększyła stężenia markerów produkowanych przez tkankę tłuszczową i śródbłonek naczyniowy. Ponadto, wzrost stężenia leptyny i LAR po leczeniu, oraz sP-selektyny zarówno przed leczeniem jak i po leczeniu wiąże się z gorszym rokowaniem u pacjentów z rakiem piersi.

Streszczenie w języku angielskim

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: Breast cancer is one of the most serious oncological problems and represents a growing social, economic and health challenge worldwide. Dysfunction of adipose tissue activity and vascular endothelial cells promotes malignant transformation; hence the aim of this study was to evaluate the concentrations of markers produced by endothelial cells (i.e. t-PA, PAI-1, soluble form of P-selectin and E-selectin, vWF) and adipose tissue (leptin, adiponectin) in a group of patients with primary, unilateral breast cancer without distant metastases. Parameters of the fibrinolysis were compared before treatment in patients with cancer and in healthy volunteers. Other markers were evaluated before and after treatment. In addition, correlations between all parameters and clinicopathological indicators and the type of treatment applied were determined. Furthermore, the study also aimed to assess the prognostic value of these parameters in predicting the occurrence of the disease and its recurrence.

MATERIAL AND METHODS: In **publication 1**, the study included 60 women aged 41-67 years (mean 52.9 years) with primary unilateral luminal A and B breast cancer without distant metastasis (M0) at stage IA-IIB. The median tumour size was 1.6 cm. Seventeen patients (28%) had lymph node metastases (N1). There were 42 cases at TNM stage I (70%) and 18 at TNM stage II (30%). Ten events occurred in the recurrence-free survival analysis, with a median follow-up time of 33 months (recurrence rate of 16.7%). The study also included 45 healthy volunteers (age range 44-68 years) with mammographically confirmed absence of breast cancer. The study assessed t-PA, PAI-1 and the t-PA/PAI-1 and PAI-1/t-PA ratio in both groups. In **publications 2 and 3**, the study included 70 patients with primary unilateral luminal A and B stage IA-IIB breast cancer without distant metastasis (M0). The median age was 54.5 years, and the median tumour size was 1.5 cm. There were 48 patients (69%) in the TNM classification of stage T1 breast cancer and 22 patients (31%) in T2. Only 17 (24%) of the 70 patients had metastasis to local lymph nodes. The median follow-up time was 68.5 months. During this study, 11 events occurred, including one distant metastasis and 10 deaths (recurrence rate: 15.71%). **Publication 2** assessed leptin and adiponectin levels before and after treatment. **Publication 3** evaluated the levels of soluble forms of P and E selectin, vWF and LAR before and after treatment.

RESULTS: As a result of statistical analyses, ROC curves were constructed in publication 1 to assess the diagnostic accuracy of fibrinolysis components, and it was noted that only for PAI-1 the diagnostic utility of the test was achieved. A plasma PAI-1 concentration of 33.91 ng/ml (sensitivity 90% and specificity 36%) was determined as the best cut-off value for distinguishing healthy individuals from breast cancer cases. Further analysis was then performed to predict disease recurrence. The highest AUC^{ROC} value was obtained for t-PA concentration. The cut-off point for t-PA concentration was set at 5.3 ng/ml (66% specificity and 70% sensitivity). This value makes it possible to distinguish between patients with and without relapse. In addition, Kaplan-Meier survival curves showed that patients with a pre-treatment t-PA levels higher than 5 ng/ml were more likely to relapse. Disease recurrence in this group of patients occurred in 7 of 28 (25%) patients.

In publication 2, leptin and adiponectin concentrations increased regardless of the treatment regimen used. In addition, using Spearman rank correlation analysis, it was shown that leptin levels before treatment correlated positively with leptin levels after treatment and negatively with adiponectin levels after treatment, and that adiponectin levels before treatment correlated positively with adiponectin levels after treatment. In the next stage of statistical analysis, ROC curves were constructed, and Kaplan-Meier survival analyses were performed. Based on the results of the study, post-treatment leptin concentration was found to be the strongest predictor of relapse. In addition, a post-treatment leptin concentration of 26.88 ng/ml with a sensitivity of 88.9% and specificity of 64.9% was found to be the best cut-off value to distinguish between patients with and without relapse using the maximum value of the Youden index. The final step in the statistical analysis was to determine linear regression models between pre- and post-treatment adipokines and disease-free survival. Regardless of adjusted factors, they showed that higher leptin levels after treatment were correlated with shorter disease progression-free survival.

In the third publication, regardless of the treatment regimen used, LAR and vascular endothelial markers increased after treatment. Pre-treatment markers were found to correlate positively with their post-treatment counterparts using Spearman rank correlation. Furthermore, the associations of LAR and vascular endothelial markers before and after treatment and disease-free survival were determined using linear regression. A higher risk of breast cancer recurrence was associated with lower sP-selectin levels after treatment confirmed by linear regression. In addition, Kaplan-Meier curves were performed to

determine overall survival and disease-free period. Patients with post-treatment LAR levels lower than 0.82 had significantly better overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) according to the median cut-off. In addition, patients with post-treatment LAR levels below 0.83 showed better OS and DFS than patients with post-treatment LAR levels above 0.83 according to the cut-off point from the ROC curve. Patients with pre-treatment sP-selectin levels lower than 265.05 ng/ml presented a significantly longer disease progression-free period than patients with pre-treatment sP-selectin levels higher than 265.05 ng/ml, according to the median cut-off value. In addition, patients with pre-treatment sP-selectin concentration below 247.40 ng/ml (cut-off point from the ROC curve) had a longer disease-free period.

CONCLUSIONS: It was found that the concentrations of t-PA and PAI-1, sP-selectin before treatment and the concentration of leptin after treatment can serve as both predictive and prognostic markers in early-stage breast cancer. The complementary therapy used, regardless of the treatment regimen chosen, increased the concentrations of markers produced by adipose tissue and vascular endothelium. In addition, increased levels of leptin and LAR after treatment, and sP-selectin both before and after treatment are associated with a worse prognosis in breast cancer patients.

VIII. PIŚMIENNICTWO

1. Macias H, Hinck L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2012;1(4):533-557. doi:10.1002/wdev.35
2. Drew P, Cawthorn S, Michell M. *Interventional ultrasound of the breast anatomy of the breast by Menos Lagopoulos.* London, UK: Informa Healthcare; 2007: 11–22.
3. Pandya S, Moore RG. Breast development and anatomy. *Clin Obstet Gynecol.* 2011;54(1):91-95. doi:10.1097/GRF.0b013e318207ffe9
4. Sainsbury R. The Breast: Comprehensive management of benign and malignant disorders. *Br J Cancer.* 2004;91(9):1754. doi:10.1038/sj.bjc.6602192
5. https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm dostęp z dnia 18.11.2023 r.
6. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> dostęp z dnia 18.11.2023 r.
7. <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/3986-breast-cancer> dostęp z dnia 31.07.2023 r.
8. Breast Cancer Awareness Month 2021, WHO. Dostępne na stronie: <https://www.iarc.who.int/featured-news/breast-cancer-awareness-month-2021/> dostęp z dnia 1.08.2023
9. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17-48. doi:10.3322/caac.21763
10. Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, Kramer JL., Newman LA., Minihan A., Jemal A., Siegel RL. Breast Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(6):524-541. doi:10.3322/caac.21754
11. Wojciechowska U, Barańska K, Michałek I, Olasek P, Miklewska M, Didkowska JA. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2020 roku, Krajowy Rejestr Nowotworów, Warszawa 2022*
12. American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2017–2018.* American Cancer Society, Inc., Atlanta 2017. Dostępne na stronie: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/breast-cancer-facts-figures.html>
13. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html> dostęp z dnia 18.11.2023 r.

14. Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H. Breast cancer—epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature). *Cancers* 2022, 14, 2569. doi:10.3390/cancers14102569
15. Murphy CE, Carder PJ, Lansdown MR, Speirs V. Steroid hormone receptor expression in male breast cancer. *Eur J of Surg Oncol.* 2006;32:44–7. doi: 10.1016/j.ejso.2005.09.013
16. Casaubon JT, Kashyap S, Regan JP. BRCA1 and BRCA2 Mutations. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 23, 2023. Dostępne na stronie: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470239/>
17. Nardin S, Mora E, Varughese FM, D’Avanzo F, Vachanaram AR, Rossi V, Saggia C, Rubinelli S, Gennari A. Breast cancer survivorship, quality of life, and late toxicities. *Front. Oncol.* 2020, 16, 864 doi: 10.3389/fonc.2020.00864
18. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* 2011, 12, 68–78. doi: 10.1038/nrc3181
19. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996, 347, 1713–1727. doi: 10.1016/s0140-6736(96)90806-5
20. Carney PA, Miglioretti DL, Yankaskas BC, Kerlikowske K, Rosenberg R, Rutter CM, et al. Individual and combined effects of age, breast density, and hormone replacement therapy use on the accuracy of screening mammography [published correction appears in *Ann Intern Med.* 2003 May 6;138(9):771]. *Ann Intern Med.* 2003;138(3):168-175. doi:10.7326/0003-4819-138-3-200302040-00008
21. Vachon CM, van Gils CH, Sellers TA, Ghosh K, Pruthi S, Brandt KR. Mammographic density, breast cancer risk and risk prediction. *Breast Cancer Res.* 2007;9(6):217. doi: 10.1186/bcr1829
22. Fletcher SW, Elmore JG. Clinical practice. Mammographic screening for breast cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(17):1672–1680 doi: 10.1056/NEJMcp021804
23. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(3):227–236 doi: 10.1056/NEJMoa062790
24. McCormack VA, Dos Santos Silva I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(6):1159–1169. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0034

25. D'Orsi CJ, Sickles EA., Mendelson EB, Morris EA. ACR BI-RADS® atlas, breast imaging reporting and data system. American College of Radiology; Reston, VA: 2013.
26. Clavel-Chapelon F. E3N Group. Cumulative number of menstrual cycles and breast cancer risk: results from the E3N cohort study of French women. *Cancer Causes Control*. 2002;13(9):831-838. doi:10.1023/a:1020684821837
27. Parsa P, Parsa B. Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2009. Dec;10(4):545–50
28. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*. 2012, 13, 1141–1151. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70425-4
29. Mulder RL, Kremer LC, Hudson MM, Bhatia S, Landier W, Levitt G, et al. Recommendations for breast cancer surveillance for female survivors of childhood, adolescent, and young adult cancer given chest radiation: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. *Lancet Oncol*. 2013;14(13):e621-e629. doi:10.1016/S1470-2045(13)70303-6
30. Seiler A, Chen MA, Brown RL, Fagundes CP. Obesity, dietary factors, nutrition, and breast cancer risk. *Curr Breast Cancer Rep*. 2018;10(1):14-27. doi:10.1007/s12609-018-0264-0
31. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014;2014:149185. doi:10.1155/2014/149185
32. Lynch BM, Neilson HK, Friedenreich CM. Physical activity and breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res*. 2011;186:13-42. doi:10.1007/978-3-642-04231-7_2
33. Kuhl H. Breast cancer risk in the WHI study: the problem of obesity. *Maturitas*. 2005;51(1):83–97. doi: 10.1016/j.maturitas.2005.02.018
34. Shah NR, Wong T. Current breast cancer risks of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Expert Opin Pharmacother*. 2006;7(18):2455-2463. doi:10.1517/14656566.7.18.2455
35. Narod, S. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8: 669–676. doi:10.1038/nrclinonc.2011.110
36. White ND. Hormonal Contraception and Breast Cancer Risk. *Am J Lifestyle Med*. 2018;12(3):224-226. doi:10.1177/1559827618754833

37. Iversen L, Sivasubramaniam S, Lee AJ, Fielding S, Hannaford PC. Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: the Royal College of General Practitioners' oral contraception study. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;216:580.e1-580.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2017.02.002
38. Passarelli MN, Newcomb PA, Hampton JM, Trentham-Dietz A, Titus LJ, Egan KM, et al. Cigarette smoking before and after breast cancer diagnosis: mortality from breast cancer and smoking-related diseases. *J Clin Oncol.* 2016;34(12):1315-1322. doi:10.1200/JCO.2015.63.9328
39. Tyagi A, Sharma S, Wu K, Wu SY, Xing F, Liu Y, et al. Nicotine promotes breast cancer metastasis by stimulating N2 neutrophils and generating pre-metastatic niche in lung. *Nat Commun.* 2021;12(1):474. Published 2021 Jan 20. doi:10.1038/s41467-020-20733-9
40. Nardin S, Mora E, Varughese FM, D'Avanzo F, Vachanaram AR, Rossi V, Saggia C, Rubinelli S, Gennari A. Breast cancer survivorship, quality of life, and late toxicities. *Front. Oncol.* 2020, 16, 864 doi: 10.3389/fonc.2020.00864
41. Li J, Guan X, Fan Z, Ching LM, Li Y, Wang X, et al. Non-invasive biomarkers for early detection of breast cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(10):2767. doi:10.3390/cancers12102767
42. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/american-cancer-society-recommendations-for-the-early-detection-of-breast-cancer.html> dostęp z dnia 4.10.2023 r.
43. <https://www.hopkinsmedicine.org/health/treatment-tests-and-therapies/breast-biopsy> dostęp z dnia 18.12.2023 r.
- 44 <https://zaawansowanyrakpiersi.pl/rak-piersi/leczenie/> dostęp z dnia 4.08.2023 r.
45. Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular classification of breast carcinoma: from traditional, old-fashioned way to a new age, and a new way. *J Breast Health.* 2015;11(2):59-66. doi:10.5152/tjbh.2015.1669
46. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 2010 Nov 15;10(10):955-60. doi: 10.4161/cbt.10.10.13879.
47. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. Subtypes of breast cancer. In: Mayrovitz HN, ed. *Breast Cancer*. Brisbane (AU): Exon Publications; August 6, 2022. doi: 10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes
48. <https://zaawansowanyrakpiersi.pl/podtypy-biologiczne-zaawansowanego-raka-piersi/> dostęp z dnia 20.08.2023 r.

49. Pieńkowski T, Olszewski WT. Zmiany w klasyfikacji TNM raka piersi, *J Oncol.* 2003;35(4):281-8
50. 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.
51. van Doonijeweert C, van Diest PJ, Ellis IO. Grading of invasive breast carcinoma: the way forward. *Virchows Arch* 2022;480, 33–43. doi:10.1007/s00428-021-03141-2
52. 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
53. 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
54. <https://medigence.com/blog/breast-cancer-treatment-options/> dostęp z dnia 4.10.2023 r.
55. <https://trial-in.com/breast-cancer/breast-cancer-benefits-of-trodelvy-in-hr-her2/> dostęp z dnia 4.10.2023 r.
56. Thompson AM, Moulder-Thompson SL. Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 10(Suppl 10):x231-x236. doi:10.1093/annonc/mds324
57. Flatley MJ, Dodwell DJ. Adjuvant treatment for breast cancer, *Surgery (Oxford)*, 2019;37(3):176-180, doi: 10.1016/j.mpsur.2019.02.005.
58. Riis M. Modern surgical treatment of breast cancer. *Ann Med Surg (Lond).* 2020;56:95-107. Published 2020 Jun 23. doi:10.1016/j.amsu.2020.06.016
59. Jordan RM, Oxenberg J. Breast cancer conservation therapy. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; September 19, 2022.
60. Goethals A, Rose J. Mastectomy. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; October 6, 2022.
61. <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2021/breast-cancer-mastectomy-quality-of-life> dostęp z dnia 22.08.23
62. Polgár C, Kahán Z, Ivanov O, Chorváth M, Ligačová A, Csejtei A, et al. Radiotherapy of breast cancer-professional guideline 1st Central-Eastern European Professional Consensus Statement on breast cancer. *Pathol Oncol Res.* 2022;28:1610378. Published 2022 Jun 23. doi:10.3389/pore.2022.1610378

63. Hennequin C, Belkacémi Y, Bourgier C, Cowen D, Cutuli B, Fourquet A, et al. Radiotherapy of breast cancer. *Cancer Radiother.* 2022;26(1-2):221-230. doi:10.1016/j.canrad.2021.11.013
64. Sanz J, Eraso A, Ibáñez R, Williams R, Algara M. Tumor bed boost radiotherapy in the conservative treatment of breast cancer: A review of intra-operative techniques and outcomes. *Cancers.* 2023; 15(16):4025. doi:10.3390/cancers15164025
65. Abotaleb M, Kubatka P, Caprnda M, Varghese E, Zolakova B, Zubor P, et al. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. *Biomed Pharmacother.* 2018;101:458-477. doi:10.1016/j.biopha.2018.02.108
66. Henriques B, Mendes F, Martins D. Immunotherapy in breast cancer: When, how, and what challenges? *Biomedicines.* 2021;9(11):1687. doi:10.3390/biomedicines9111687
67. Petito G, Cioffi F, Magnacca N, de Lange P, Senese R, Lanni A. Adipose tissue remodeling in obesity: An overview of the actions of thyroid hormones and their derivatives. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 572. doi:10.3390/ph16040572
68. Murawska-Ciałowicz E. Adipose tissue - morphological and biochemical characteristic of different depots. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2017;71(0):466-484. doi:10.5604/01.3001.0010.3829
69. Cinti S. Adipose organ development and remodeling. *Compr Physiol.* 2018;8(4):1357-1431. doi:10.1002/cphy.c170042
70. Siemińska L. Tkanka tłuszczowa. *Patofizjologia, rozmieszczenie, różnice płciowe oraz znaczenie w procesach zapalnych i nowotworowych, Endokrynologia Polska* 2007, 58 (4), 330-342
71. Altinova AE. Beige Adipocyte as the flame of white adipose tissue: Regulation of browning and impact of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(5):e1778-e1788. doi:10.1210/clinem/dgab921
72. Clemente-Suárez VJ, Redondo-Flórez L, Beltrán-Velasco AI, Martín-Rodríguez A, Martínez-Guardado I, Navarro-Jiménez E, et al. The role of adipokines in health and disease. *Biomedicines.* 2023;11(5):1290. Published 2023 Apr 27. doi:10.3390/biomedicines11051290
73. <https://biologydictionary.net/adipocyte/#foobox-2/0/brownbeigewhite.jpg> dostęp z dnia 5.09.23
74. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci.* 2013;9(2):191-200. doi:10.5114/aoms.2013.33181

75. Kumar SS, Mishra AK, Ghosh AR. Endocrine role of adipose tissue in obesity and related disorders. In: Tappia, P.S., Ramjiawan, B., Dhalla, N.S. (eds) Cellular and Biochemical Mechanisms of Obesity. Advances in Biochemistry in Health and Disease, Springer, Cham.2021;23. doi:10.1007/978-3-030-84763-0_2 Dostęp ze strony: https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-3-030-84763-0_2/MediaObjects/473410_1_En_2_Fig1_HTML.png
76. Lengyel E, Makowski L, DiGiovanni J, Kolonin MG. Cancer as a matter of fat: The crosstalk between adipose tissue and tumors. Trends Cancer. 2018;4(5):374-384. doi:10.1016/j.trecan.2018.03.004
77. Steele CB, Thomas CC, Henley J, Massetti GM, Galuska DA, Agurs-Collins T, Puckett M, Richardson LC. Vital Signs: Trends in incidence of cancers associated with overweight and obesity—United States, 2005–2014. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2017, 66, 1052–1058. doi: 10.15585/mmwr.mm6639e1
78. Brown KA, Scherer PE. Update on adipose tissue and cancer [published online ahead of print, 2023 Jun 1]. Endocr Rev. 2023;bnad015. doi:10.1210/endrev/bnad015
79. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. Biochim Biophys Acta. 2013;1831(10):1533-1541. doi:10.1016/j.bbali.2013.02.010
80. Gouon-Evans V, Pollard JW. Unexpected deposition of brown fat in mammary gland during postnatal development. Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)2002; 16: 2618–2627 doi:10.1210/me.2001-0337
81. Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV. Anatomical, Physiological, and functional diversity of adipose tissue. Cell Metab. 2018;27(1):68-83. doi:10.1016/j.cmet.2017.12.002
82. Bielawski K, Rhone P, Bulsa M, Ruzkowska-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, 1742. doi:10.3390/jcm9061742
83. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. CA Cancer J Clin. 2017;67(5):378-397. doi:10.3322/caac.21405

84. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 May;280(5):E745-51. doi: 10.1152/ajpendo.2001.280.5.E745.
85. Socol CT, Chira A, Martinez-Sanchez MA, Nuñez-Sanchez MA, Maerescu CM, Mierlita D, Rusu AV, Ruiz-Alcaraz AJ, Trif M, Ramos-Molina B. Leptin signaling in obesity and colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 4713. doi:10.3390/ijms2309471
86. La Cava A, Alviggi C, Matarese G. Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *J. Mol. Med.* 2004, 82, 4–11. doi: 10.1007/s00109-003-0492-1
87. Rock FL, Altmann SW, van Heek M, Kastelein RA, Bazan JF. The leptin haemopoietic cytokine fold is stabilized by an intrachain disulfide bond. *Horm. Metab. Res.* 1996, 28, 649–652. doi: 10.1055/s-2007-979871
88. Jiménez-Cortegana C, Hontecillas-Prieto L, García-Domínguez DJ, Zapata F, Palazón-Carrión N, Sánchez-León ML, et al. Obesity and risk for lymphoma: Possible role of leptin. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 15530. doi:10.3390/ijms232415530
89. 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 doi: 10.3389/fonc.2019.00596
90. Jiménez-Cortegana C, López-Saavedra A, Sánchez-Jiménez F, Pérez-Pérez A, Castiñeiras J, Virizuela-Echaburu JA, de la Cruz-Merino Ldl, Sánchez-Margalet V. Leptin, both bad and good actor in cancer. *Biomolecules* 2021, 11, 913. doi:10.3390/biom11060913
91. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in inflammation and vice versa. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 5887. doi:10.3390/ijms21165887
92. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults, *New England Journal of Medicine*, 2003;348: 1625-1638. doi: 10.1056/NEJMoa021423
93. Caruso A, Gelsomino L, Panza S, Accattatis FM, Naimo GD, Barone I, Giordano C, Catalano S, Andò S. Leptin: A heavyweight player in obesity-related cancers. *Biomolecules.* 2023, 13, 1084. doi:10.3390/biom13071084
94. Buonaiuto R, Napolitano F, Parola S, De Placido P, Forestieri V, Pecoraro G, et al. Insight on the role of leptin: A bridge from obesity to breast cancer. *Biomolecules.* 2022, 12, 1394. doi:10.3390/biom12101394

95. Dutta D, Ghosh S, Pandit K, Mukhopadhyay P, Chowdhury S. Leptin and cancer: Pathogenesis and modulation. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012 Dec;16(Suppl 3):S596-600. doi: 10.4103/2230-8210.105577.
96. Khoramipour K, Chamari K, Hekmatikar AA, Ziyaiyan A, Taherkhani S, Elguindy NM, Bragazzi NL. Adiponectin: Structure, physiological functions, role in diseases, and effects of nutrition. *Nutrients.* 2021;13(4):1180. doi: 10.3390/nu13041180.
97. Garaulet M, Hernández-Morante J, De Heredia F, Tébar F. Adiponectin, the controversial hormone. *Public Health Nutrition.* 2007;10(10A), 1145-1150. doi:10.1017/S1368980007000638
98. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature* 2006; 6: 772–783. doi: 10.1038/nri1937
99. María Luz Gunturiz Albarracín MA, Forero Torres AY. Adiponectin and leptin adipocytokines in metabolic syndrome: What is its importance? *Dubai Diabetes Endocrinol J* 2020; 26 (3): 93–102. doi:10.1159/000510521
100. Parida S, Siddharth S, Sharma D. Adiponectin, obesity, and cancer: Clash of the bigwigs in health and disease. *Int J Mol Sci.* 2019 May 22;20(10):2519. doi: 10.3390/ijms20102519.
101. Tsankof A, Tziomalos K. Adiponectin: A player in the pathogenesis of hormone-dependent cancers. *Front. Endocrinol.*2022;13:1018515. doi: 10.3389/fendo.2022.1018515
102. Liu J, Lam JBB, Chow KHM, Xu A, Lam KSL, Moon RT, Wang Y. Adiponectin stimulates Wnt Inhibitory Factor-1 expression through epigenetic regulations involving the transcription factor specificity Protein 1. *Carcinogenesis* 2008, 29, 2195–2202. doi: 10.1093/carcin/bgn194
103. Chung SJ, Nagaraju GP, Nagalingam A, Muniraj N, Kuppusamy P, Walker A, et al. ADIPOQ/Adiponectin induces cytotoxic autophagy in breast cancer cells through STK11/LKB1-mediated activation of the AMPK-ULK1 axis. *Autophagy* 2017, 13, 1386. doi: 10.1080/15548627.2017.1332565
104. Pham D-V, Park P-H. Adiponectin triggers breast cancer cell death via fatty acid metabolic reprogramming. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2022, 41, doi: 10.1186/s13046-021-02223-y
105. Nehme R, Diab-Assaf M, Decombat C, Delort L, Caldefie-Chezet F. Targeting adiponectin in breast cancer. *Biomedicines* 2022, 10, 2958. doi:10.3390/biomedicines10112958
106. Saxena NK, Sharma D. Metastasis suppression by adiponectin: LKB1 rises up to the challenge. *Cell Adh Migr.* 2010;4(3):358-362. doi:10.4161/cam.4.3.11541

107. Agostinis-Sobrinho C, Vicente SECF, Norkiene S, Rauckiene' -Michaelsson A, Kievisiene' J, Dubey VP, Razbadauskas A, Lopes L, Santos R. Is the leptin/adiponectin ratio a better diagnostic biomarker for insulin resistance than leptin or adiponectin alone in adolescents? *Children* 2022, 9, 1193 doi: 10.3390/children9081193
108. Zurita-Cruz JN, Villasís-Keever MA, Manuel-Apolinar L, Damasio-Santana L, Garrido-Magaña E and Rivera-Hernández AdJ. Leptin/adiponectin ratio as a prognostic factor for increased weight gain in girls with central precocious puberty. *Front. Endocrinol.* 2023;14:1101399. doi: 10.3389/fendo.2023.1101399
109. Zaletel J, Barlovic DP, Prezelj J. Adiponectin-leptin ratio: A useful estimate of insulin resistance in patients with Type 2 diabetes. *J. Endocrinol. Investig.* 2010, 33, 514–518. doi: 10.1007/BF03346639
110. Bocian-Jastrzębska A, Malczewska-Herman A, Rosiek V, Kos-Kudła B. Assessment of the role of leptin and adiponectinas biomarkers in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Cancers.* 2023; 15(13):3517. doi:10.3390/cancers15133517
111. Słomian GJ, Nowak D, Buczkowska M, Głogowska-Gruszka A, Słomian SP, Rocznik W, et al. The role of adiponectin and leptin in the treatment of ovarian cancer patients. *Endokrynol Pol.* 2019;70(1):57-63. doi:10.5603/EP.a2018.0081
112. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013 Nov 9;9(10):1057-69. doi:10.7150/ijbs.7502.
113. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular endothelial cell biology: An update. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 7;20(18):4411. doi:10.3390/ijms20184411.
114. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *The Journal of The American Society of Hematology Blood.* 1998;91(10):3527–3561
115. <https://www.britannica.com/science/artery> Dostęp z dnia 22.09.23 r.
116. Kwaifa IK, Bahari H, Yong YK, Noor SM. Endothelial dysfunction in obesity-induced inflammation: Molecular mechanisms and clinical implications. *Biomolecules.* 2020;10(2):291. doi:10.3390/biom10020291
117. Sena CM, Carrilho F, Seíça RM. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes: Targeting inflammation old concepts and new challenges. London: IntechOpen; 2018 doi: 10.5772/intechopen.76994

118. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057-1069. doi:10.7150/ijbs.7502
119. Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol.* 2015;7(11):719-741. doi:10.4330/wjc.v7.i11.719
120. Xu S, Ilyas I, Little PJ, Li H, Kamato D, Zheng X, et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: From mechanism to pharmacotherapies. *Pharmacol Rev.* 2021;73(3):924-967. doi:10.1124/pharmrev.120.000096
121. Goncharov NV, Nadeev AD, Jenkins RO, Avdonin PV. Markers and biomarkers of endothelium: When something is rotten in the State. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:9759735. doi:10.1155/2017/9759735
122. Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence.* 2013;4(6):507-516. doi:10.4161/viru.24530
123. Agrati C, Sacchi A, Tartaglia E, Vergori A, Gagliardini R, Scarabello A, Bibas M. The role of P-selectin in COVID-19 coagulopathy: An updated review. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021; 22(15):7942. doi:10.3390/ijms22157942
124. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol.* 2004;93(11):855-863. doi:10.1007/s00392-004-0146-5
125. Polek A, Sobiczewski W, Matowicka-Karna J. P-selektyna i jej rola w niektórych chorobach [P-selectin and its role in some diseases]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2009;63:465-470. Published 2009 Oct 19.
126. Majchrzak-Baczmanska D, Pogoda K, Oblekowska A, Owczarek D, Antosiak B, Wojciechowski M, et al. Evaluation of serum levels of soluble (s)L- and (s)P-selectins in endometrial cancer [published online ahead of print, 2023 Jul 7]. *Ginekol Pol.* 2023;10.5603/GP.a2023.0056. doi:10.5603/GP.a2023.0056
127. Buurman, W.A., von Asmuth, E.J.U., Leeuwenberg, J.F.M. (1993). E-Selectin, internalization and release. In: Schlag, G., Redl, H., Traber, D. (eds) Shock, sepsis, and organ failure. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-77420-1_4
128. Jubeli E, Moine L, Vergnaud-Gauduchon J, Barratt G. E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. *J Control Release.* 2012;158(2):194-206. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.084

129. Raffray L, Giry C, Thirapathi Y, Reboux AH, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Increased levels of soluble forms of E-selectin and ICAM-1 adhesion molecules during human leptospirosis. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180474. Published 2017 Jul 7. doi:10.1371/journal.pone.0180474
130. Borsig L. Selectins in cancer immunity. *Glycobiology*. 2018;28(9):648-655. doi:10.1093/glycob/cwx105
131. Läubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(3):169-177. doi:10.1016/j.semcancer.2010.04.005
132. Natoni A, Macauley MS, O'Dwyer ME. Targeting selectins and their ligands in cancer. *Front. Oncol*. 2016; 6:93. doi: 10.3389/fonc.2016.00093
133. Rhone P, Zarychta E, Bielawski K, Ruszkowska-Ciastek B. Pre-surgical level of von Willebrand factor as an evident indicator of breast cancer recurrence. *Cancer Biomark*. 2020;29(3):359-372. doi:10.3233/CBM-191096
134. Fabricius H-Å, Starzonek S, Lange T. The role of platelet cell surface P-selectin for the direct platelet-tumor cell contact during metastasis formation in human tumors. *Front. Oncol*. 2021;11:642761. doi: 10.3389/fonc.2021.642761
135. Lippi G, Favaloro EJ. Hemostasis practice: state-of-the-art. *J Lab Precis Med* 2018;3:67. doi: 10.21037/jlpm.2018.07.07
136. Scridon A. Platelets and their role in hemostasis and thrombosis—from physiology to pathophysiology and therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(21):12772. doi:10.3390/ijms232112772
137. McRae S. Physiological Haemostasis. In: Fitridge R, Thompson M, editors. *Mechanisms of vascular disease: A reference book for vascular specialists* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. 9. Dostęp: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534253/>
138. Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*. 2006;107(9):3537-3545. doi:10.1182/blood-2005-02-0618
139. Hou Y, Carrim N, Wang Y, Gallant RC, Marshall A, Ni H. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis [published online ahead of print, 2015 Oct 30]. *J Biomed Res*. 2015;29(6):437-444. doi:10.7555/JBR.29.20150121

140. Periyah MH, Halim AS, Mat Saad AZ. Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in hemostasis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2017;11(4):319-327.
141. Gale AJ. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol.* 2011;39(1):273-280. doi:10.1177/0192623310389474
142. Al-Koussa H, AlZaim I, El-Sabban ME. Pathophysiology of coagulation and emerging roles for extracellular vesicles in coagulation cascades and disorders. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 4932. doi:10.3390/jcm11164932
143. Chaudhry R, Usama SM, Babiker HM. Physiology, coagulation pathways. [Updated 2022 Aug 29]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Dostęp: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/>
144. LaPelusa A, Dave HD. Physiology, Hemostasis. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Dostęp: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545263/>
145. Du J, Wang J, Xu T, Yao H, Yu L, Huang D. Hemostasis strategies and recent advances in nanomaterials for hemostasis. *Molecules.* 2023; 28(13):5264. doi:10.3390/molecules28135264
146. Ho KM, Pavey W. Applying the cell-based coagulation model in the management of critical bleeding. *Anaesth Intensive Care.* 2017;45(2):166-176. doi:10.1177/0310057X1704500206
147. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus.* 2011;9 Suppl 2(Suppl 2):s3-s8. doi:10.2450/2011.002S
148. Castaman G, Linari S. Diagnosis and treatment of von Willebrand Disease and rare bleeding disorders. *Journal of Clinical Medicine.* 2017; 6(4):45. doi:10.3390/jcm6040045
149. Denis CV, Roullet S, Perrin J. Von Willebrand factor and cancer: Another piece of the puzzle. *J Thromb Haemost.* 2022;20(10):2207-2210. doi:10.1111/jth.15810
150. Patmore S, Dhimi SPS, O'Sullivan JM. Von Willebrand factor and cancer; metastasis and coagulopathies. *J Thromb Haemost.* 2020;18(10):2444-2456. doi:10.1111/jth.14976
151. Colonne CK, Favaloro EJ, Pasalic L. The Intriguing Connections between von Willebrand Factor, ADAMTS13 and Cancer. *Healthcare (Basel).* 2022;10(3):557. Published 2022 Mar 16. doi:10.3390/healthcare10030557

152. Risman RA, Kirby NC, Bannish BE, Hudson NE, Tutwiler V. Fibrinolysis: an illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost.* 2023;7(2):100081. Published 2023 Feb 17. doi:10.1016/j.rpth.2023.100081
153. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* 2015;13 Suppl 1:S98-S105. doi:10.1111/jth.12935
154. Lin H, Xu L, Yu S, Hong W, Huang M, Xu P, et al. Therapeutics targeting the fibrinolytic system. *Exp Mol Med*52, 367–379 (2020). doi:10.1038/s12276-020-0397-x
155. Jilani TN, Siddiqui AH. Tissue plasminogen activator. [Updated 2023 Feb 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Dostęp: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507917/>
156. Yaron JR, Zhang L, Guo Q, Haydel SE and Lucas AR. Fibrinolytic serine proteases, therapeutic serpins and inflammation: Fire dancers and firestorms. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021;8:648947. doi: 10.3389/fcvm.2021.648947
157. Corte MD, Vérez P, Rodríguez JC, Roibás A, Domínguez ML, Lamelas ML, et al. Tissue-type plasminogen activator (tPA) in breast cancer: relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;90(1):33-40. doi:10.1007/s10549-004-2624-x
158. Rhone P, Ruszkowska-Ciastek B, Bielawski K, Brkic A, Zarychta E, Góralczyk B, et al. Comprehensive analysis of haemostatic profile depending on clinicopathological determinants in breast cancer patients. *Biosci Rep.* 2018;38(2):BSR20171657. doi:10.1042/BSR20171657
159. Duan P, Ni C. t-PA stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/p38 signaling pathways. *Pharmazie* 2014; 69: 70–75.
160. Placencio VR, DeClerck YA. Plasminogen activator Inhibitor-1 in cancer: Rationale and insight for future therapeutic testing. *Cancer Res.* 2015;75(15):2969-2974. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0876
161. Kubala MH, DeClerck YA. The plasminogen activator inhibitor-1 paradox in cancer: a mechanistic understanding. *Cancer Metastasis Rev.* 2019;38(3):483-492. doi:10.1007/s10555-019-09806-4
162. Ferroni P, Roselli M, Portarena I, Formica V, Riondino S, LA Farina F, et al. Plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels in breast cancer - relationship with clinical outcome. *Anticancer Res* 2014; 34: 1153–1161

IX. SPIS RYCIN

| | |
|---|----|
| Rycina 1. Prawidłowa budowa gruczołu piersiowego (modyfikacja własna) | 10 |
| Rycina 2. Budowa gruczołu piersiowego z guzem w ujęciu bocznym (modyfikacja własna) .. | 11 |
| Rycina 3. Czynniki ryzyka raka piersi | 12 |
| Rycina 4. Schemat diagnostyki raka piersi | 17 |
| Rycina 5. Klasyfikacje nowotworu piersi | 18 |
| Rycina 6. Uproszczona klasyfikacja histologiczna | 18 |
| Rycina 7. Sposoby leczenia raka piersi (modyfikacja własna) | 23 |
| Rycina 8. Typy operacji chirurgicznych piersi w modyfikacji własnej | 25 |
| Rycina 9. Morfologia trzech typów komórek tłuszczowych (modyfikacja własna) | 32 |
| Rycina 10. Funkcje tkanki tłuszczowej (modyfikacja własna) | 33 |
| Rycina 11. Zachowanie adipokin w zależności od aktywności tkanki tłuszczowej (modyfikacja własna)..... | 34 |
| Rycina 12. Lokalizacja śródbłonka naczyniowego na przekroju przez ścianę tętnicy (modyfikacja własna) | 41 |
| Rycina 13. Ważne funkcje i substancje wydzielane przez śródbłonek naczyniowy (modyfikacja własna) | 42 |
| Rycina 14. Mechanizm dysfunkcji śródbłonka naczyniowego | 43 |
| Rycina 15. Aspekty uszkodzenia śródbłonka naczyniowego (modyfikacja własna) | 44 |
| Rycina 16. Schemat procesu hemostazy (modyfikacja własna) | 51 |
| Rycina 17. Schemat komórkowego modelu krzepnięcia (modyfikacja własna) | 52 |
| Rycina 18. Sygnalizacja szlaku fibrynolizy (modyfikacja własna) | 55 |
| Rycina 19. Podsumowanie graficzne wstępu teoretycznego | 57 |
| Rycina 20. Schemat blokowy metodyki badań prowadzących do powstania cyklu publikacji | 59 |

X. SPIS TABEL

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Charakterystyka podtypów biologicznych raka piersi | 19 |
| Tabela 2. Klasyfikacja kliniczna TNM | 20 |
| Tabela 3. Klasyfikacja stopnia zaawansowania klinicznego raka piersi wg klasyfikacji TNM (modyfikacja własna) | 21 |
| Tabela 4. System oceny złośliwości histologicznej Elston-Ellis | 22 |
| Tabela 5. Wybrane leki chemioterapeutyczne stosowane w raku piersi i ich sposób działania | 27 |
| Tabela 6. Wybrane adipocytokiny wydzielane przez tkankę tłuszczową do krwioobiegu i ich funkcje | 32 |
| Tabela 7. Wybrane cechy i funkcje adiponektyny i leptyny | 40 |
| Tabela 8. Przebieg procesu krzepnięcia według komórkowego modelu | 52 |

XI. OŚWIADCZENIA

Publikacja nr 1:

*Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia 26 września 2023 r.
w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora
na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu*

Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Dr hab. Barbara Ruszkowska-Ciastek, prof. UMK
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Ruszkowska-Ciastek B, Kwiatkowska K, Bielawska S, Robakowska M, Bielawski K, Rhone P. Evaluation of the prognostic value of fibrinolytic elements in invasive breast carcinoma patients. *Neoplasma*. 2020;67(5):1146-1156; mój udział polegał na koncepcji badania, sformułowaniu hipotezy badawczej oraz końcowej akceptacji manuskryptu. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 45%.

Barbara Ruszkowska-Ciastek
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Mgr Sylwia Bielawska
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Ruskowska-Ciastek B, Kwiatkowska K, Bielawska S, Robakowska M, Bielawski K, Rhone P. Evaluation of the prognostic value of fibrinolytic elements in invasive breast carcinoma patients. *Neoplasma*. 2020;67(5):1146-1156; mój udział polegał na wstępnej obróbce materiału biologicznego i weryfikacji danych w literaturze. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 3%.


(podpis)


Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Dr n. med. Kornel Bielawski
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Ruszkowska-Ciastek B, Kwiatkowska K, Bielawska S, Robakowska M, Bielawski K, Rhone P. Evaluation of the prognostic value of fibrinolytic elements in invasive breast carcinoma patients. *Neoplasma*. 2020;67(5):1146-1156; mój udział polegał wykonaniu analizy statystycznej i wstępnej analizie wyników. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 4%.


.....
(podpis)

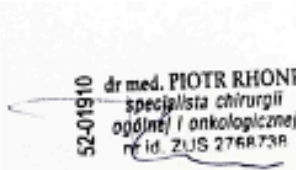
Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Dr n. med. Piotr Rhone
Oddział Kliniczny Nowotworów Piersi
i Chirurgii Rekonstrukcyjnej
Centrum Onkologii
im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Ruszkowska-Ciastek B, Kwiatkowska K, Bielawska S, Robakowska M, Bielawski K, Rhone P. Evaluation of the prognostic value of fibrinolytic elements in invasive breast carcinoma patients. *Neoplasma*. 2020;67(5):1146-1156; mój udział polegał na weryfikacji i kwalifikacji pacjentek do grupy badanej. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.



52-01910 dr med. PIOTR RHONE
specjalista chirurgii
ogólnej i onkologicznej
nr id. ZUS 2768738

.....
(podpis)

Publikacja nr 2:

Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia 26 września 2023 r.
w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora
na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Dr n. med. Piotr Rhone
Oddział Kliniczny Nowotworów Piersi
i Chirurgii Rekonstrukcyjnej
Centrum Onkologii
im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kwiatkowska K, Rhone P, Wrzeszcz K, Ruszkowska-Ciastek B. High post-treatment leptin concentration as a prognostic biomarker of the high risk of luminal breast cancer relapse: A six-year comprehensive study. *Life (Basel)*. 2022;12(12):2063; mój udział polegał na weryfikacji i kwalifikacji pacjentek do grupy badanej. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 8%.

52-01910 dr med. PIOTR RHONE
specjalista chirurgii
ogólnej i onkologicznej
nr id. ZUS 2166738

.....
(podpis)


Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Mgr Katarzyna Wrzeszcz
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kwiatkowska K, Rhone P, Wrzeszcz K, Ruszkowska-Ciastek B. High post-treatment leptin concentration as a prognostic biomarker of the high risk of luminal breast cancer relapse: A six-year comprehensive study. *Life (Basel)*. 2022;12(12):2063; mój udział polegał na wstępnej obróbce materiału biologicznego. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


.....
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Dr hab. Barbara Ruszkowska-Ciastek, prof. UMK
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kwiatkowska K, Rhone P, Wrzeszcz K, Ruszkowska-Ciastek B. High post-treatment leptin concentration as a prognostic biomarker of the high risk of luminal breast cancer relapse: A six-year comprehensive study. *Life (Basel)*. 2022;12(12):2063; mój udział polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej oraz końcowej akceptacji manuskryptu.. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 12%.

Barbara Ruszkowska-Ciastek
(podpis)

Publikacja nr 3:

Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia 26 września 2023 r.
w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora
na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Dr n. med. Piotr Rhone
Oddział Kliniczny Nowotworów Piersi
i Chirurgii Rekonstrukcyjnej
Centrum Onkologii
im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kwiatkowska K, Rhone P, Koziorzemska P, Formanowicz D, Ruszkowska-Ciastek B. Complex analysis of endothelial markers as potential prognostic indicators in luminal invasive breast carcinoma patients: Outcomes of a six-year observational study. *Biomedicines*. 2023;11(8):2246; mój udział polegał na weryfikacji i kwalifikacji pacjentek do grupy badanej. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.

52-01910 dr med. PIOTR RHONE
specjalista chirurgii
ogólnej i onkologicznej
nr id. ZUS 2768738

.....
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Mgr Paulina Koziorzemska
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kwiatkowska K, Rhone P, Koziorzemska P, Formanowicz D, Ruskowska-Ciastek B. Complex analysis of endothelial markers as potential prognostic indicators in luminal invasive breast carcinoma patients: Outcomes of a six-year observational study. *Biomedicines*. 2023;11(8):2246; mój udział polegał na wstępnej obróbce materiału biologicznego. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 3%.


(podpis)

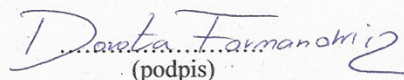
Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Dorota Formanowicz
Katedra i Zakład Chemii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kwiatkowska K, Rhone P, Koziorzemska P, Formanowicz D, Ruskowska-Ciastek B. Complex analysis of endothelial markers as potential prognostic indicators in luminal invasive breast carcinoma patients: Outcomes of a six-year observational study. *Biomedicines*. 2023;11(8):2246; mój udział polegał na wstępnej analizie wyników i propozycji wniosków. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 7%.


(podpis)


Bydgoszcz, dnia 18.12.2023 r.

Dr hab. Barbara Ruszkowska-Ciastek, prof. UMK
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kwiatkowska K, Rhone P, Koziorzemska P, Formanowicz D, Ruszkowska-Ciastek B. Complex analysis of endothelial markers as potential prognostic indicators in luminal invasive breast carcinoma patients: Outcomes of a six-year observational study. *Biomedicine*. 2023;11(8):2246; mój udział polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej oraz końcowej akceptacji manuskryptu. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.


(podpis)

XII. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

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 Ruskowska-Ciastek
Katedra Patofizjologii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie:

- prof. dr hab. n. med. D. Rość, dr n. med. B. Ruskowska-Ciastek, dr n. med. P. Rhone, dr n. med. K. Góralczyk, dr n. med. J. Boinska, mgr inż. B. Góralczyk, 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 rozpoznany 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.

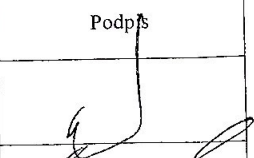
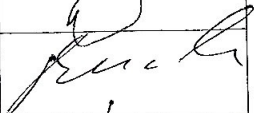
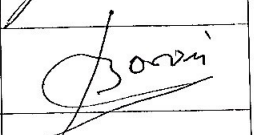
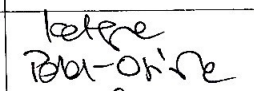
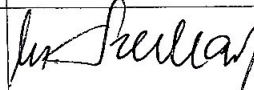
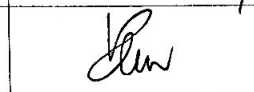
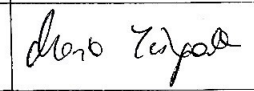
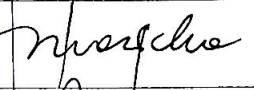
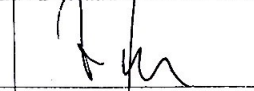
Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium 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

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 16.06.2015 r.

| Lp. | Imię i nazwisko | Funkcja | Podpł |
|-----|--|-----------------------|---|
| 1. | Prof. dr hab. med. Karol Śliwka | przewodniczący |  |
| 2. | Prof. dr hab. Adam Buciński | z-ca przewodniczącego |  |
| 3. | Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń | |  |
| 4. | Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska | | |
| 5. | Prof. dr hab. med. Marek Grabiec | | |
| 6. | Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk | | |
| 7. | Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK | |  |
| 8. | Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM | |  |
| 9. | Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska | |  |
| 10. | Dr hab. n med. Maria Kłopocka | |  |
| 11. | Mgr prawa Patrycja Brzezicka | |  |
| 12. | Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas | |  |
| 13. | Mgr piel. Hanna Ziemiarska | | |