



**UNIwersytet Medyczny**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Wydział Farmaceutyczny**  
**Katedra Analityki Medycznej**  
**Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej**

ROZPRAWA DOKTORSKA  
**Katarzyna Izabela Wadowska**

**Diagnostyczne i prognostyczne wykorzystanie oznaczeń  
potencjalnych biomarkerów raka płuca u pacjentów  
narażonych środowiskowo na ksenobiotyki dymu  
papierosowego**

*Diagnostic and prognostic application of potential biomarkers of lung  
cancer in patients with environmental exposure to tobacco smoke  
xenobiotics*

Promotor:  
**dr hab. Mariola Śliwińska-Mossoń**

Wrocław, 2023

# Streszczenie

**Wprowadzenie:** W 2020 roku rak płuca był najczęstszą przyczyną nowotworowej śmierci na świecie, odpowiedzialną za około 20% zgonów z powodu nowotworu i jednocześnie charakteryzował się on niskim współczynnikiem 5-letniego przeżycia, wynoszącym około 22%. Obecnie stosowane narzędzia diagnostyczne, to jest RTG klatki piersiowej czy badanie cytologiczne płwociny nie są wystarczająco czułymi badaniami przesiewowymi w diagnostyce raka płuca, a dostępne w diagnostyce laboratoryjnej badania markerów nowotworowych (CEA, CYFRA 21-1, NSE, SCC-Ag, ProGRP) nie umożliwiają rozpoznania raka płuca we wczesnym stadium zaawansowania choroby. Dane epidemiologiczne raka płuca wskazują na pilną potrzebę znalezienia bardziej czułych biomarkerów, które znalazłyby zastosowanie w diagnostyce raka płuca.

Rak płuca to choroba przewlekła, wieloczynnikowa, o heterogennej grupie nowotworów, co utrudnia diagnostykę, leczenie, a także zrozumienie procesów leżących u podstaw patogenezy tego nowotworu. W niniejszych badaniach oparto się na teorii mikrośrodowiska guza płuca, na które składają się komórki nowotworowe, macierz zewnątrzkomórkowa, mikrośrodowisko stanu zapalnego z komórkami immunologicznymi, cytokinami prozapalnymi i czynnikami wzrostu, które mogą być źródłem potencjalnych biomarkerów oraz uzupełnieniem diagnostyki biochemicznej aktualnie znanych markerów nowotworowych. Zmiany zachodzące w mikrośrodowisku guza płuca oddziałują na procesy nowotworzenia, progresji nowotworowej, przerzutowania, a także wpływają na ogólnoustrojową odpowiedź chorego, w tym na rozwój przewlekłego stanu zapalnego czy zaburzenia metaboliczne. Tym samym analiza zmian zachodzących w mikrośrodowisku guza płuca może pozwolić na lepsze poznanie podłoża rozwoju raka płuca, a także dalszych procesów zachodzących w organizmie pacjenta, które predysponują do gorszego przebiegu choroby, gorszej odpowiedzi na terapię, krótszego czasu przeżycia wolnego od choroby czy całkowitego czasu przeżycia.

**Cel pracy:** Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było poszerzenie aktualnej wiedzy w zakresie mechanizmów leżących u podstaw patogenezy raka płuca w oparciu o teorię mikrośrodowiska guza poprzez zbadanie zmian biochemicznych wartości potencjalnych biomarkerów, a także analiza możliwości ich zaimplementowania w diagnostyce raka płuca. Do pracy zostały wybrane biomarkery o istotnej roli w procesach zachodzących w mikrośrodowisku guza, to jest cytokiny prozapalne IL-6 i TNF- $\alpha$ , metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-2 i MMP-9, parametry

metabolizmu glukozy w komórce nowotworowej, czyli glukoza, mleczan oraz dehydrogenaza mleczanowa, a także białka ostrej fazy CRP i SAA<sub>1</sub> będące wyznacznikiem ogólnoustrojowej odpowiedzi chorego na toczące się zmiany w środowisku nowotworowym.

**Material i metody:** Rozprawa doktorska obejmuje obserwacyjne badania retrospektywne, w których porównywano pacjentów z rakiem płuca z poszczególnymi podtypami i stopniem zaawansowania nowotworu, pacjentów z rakiem płuca podzielonych w zależności od występowania powikłania pooperacyjnego, to jest niedokrwistości pooperacyjnej oraz porównywano grupę pacjentów z rakiem płuca z grupą kontrolną. Grupę badaną stanowiło 112 pacjentów z rakiem płuca, 71 mężczyzn i 41 kobiet, 50 pacjentów z gruczolakorakiem i 35 z rakiem płaskonabłonkowym, od których przed leczeniem chirurgicznym pobrano krew do badań. Grupę kontrolną stanowiło 100 zdrowych niepalących i palących ochotników. W surowicy i osoczu pacjentów z rakiem płuca oznaczono wartości stężeń markerów nowotworowych CEA, CYFRA 21-1, NSE oraz biomarkerów mikrośrodowiska guza płuca, to jest IL-6, TNF- $\alpha$ , SAA<sub>1</sub>, CRP, MMP-2, MMP-9, glukozy, mleczanu, dehydrogenazy mleczanowej, a także hormonu hepcydyny, wykorzystując testy EIA, testy ELISA oraz zautomatyzowane systemy biochemiczne. Ponadto z krwi pełnej przy użyciu gotowego zestawu komercyjnego opartego na metodzie kolumnowej zostało wyizolowane DNA, a następnie wykorzystane do badania polimorfizmu MMP-2 -735C/T oraz MMP-9 -1562C/T. Analiza statystyczna uzyskanych wyników oraz danych zebranych z dokumentacji medycznej pacjentów została przeprowadzona w pakiecie oprogramowania Statistica (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) w wersji 13.1 z użyciem dodatkowego zestawu medycznego (Plus Package, wersja 5.0.96).

**Wyniki:** Zarówno pomiędzy podtypami raka płuca, jak i pomiędzy poszczególnymi stadiami zaawansowania raka płuca występowały różnice istotne statystycznie w stężeniach glukozy. Ponadto u pacjentów z zaawansowanymi stadiami raka płuca obserwowano istotnie wyższe stężenia IL-6 oraz istotnie wyższą aktywność dehydrogenazy mleczanowej. W obrębie poszczególnych podtypów raka płuca obserwowano istotne statystycznie korelacje pomiędzy biomarkerami. Gruczolakorak charakteryzował się silnymi ujemnymi korelacjami pomiędzy wartościami stężeń IL-6 i SAA<sub>1</sub>, IL-6 i MMP-2 oraz pomiędzy MMP-2 i MMP-9, a także dodatnimi korelacjami pomiędzy IL-6 i MMP-9, SAA<sub>1</sub> i mleczanem oraz glukozą i mleczanem. Silna dodatnia korelacja pomiędzy wartościami stężeń IL-6 i MMP-9 występowała także wśród

pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym, których charakteryzowały dodatnie korelacje pomiędzy IL-6 i glukozą, SAA<sub>1</sub> i CRP oraz SAA<sub>1</sub> i mleczanem.

Różnice istotne statystycznie w surowiczych stężeniach MMP-2 i MMP-9 były obserwowane także pomiędzy zdrowymi niepalącymi i palącymi osobami z grupy kontrolnej, z wyższymi wartościami stężeń u zdrowych palących niż palących. Dodatkowo analiza polimorfizmu wykazała, że surowicze stężenia MMP-2 i MMP-9 różniły się istotnie statystycznie w zależności od odpowiednio genotypu MMP-2 -735CC i -735CT oraz MMP-9 -1562CC i -1562CT zarówno wśród pacjentów z rakiem płuca i poszczególnymi podtypami raka płuca, jak i wśród zdrowych osób niepalących i palących.

Analiza użyteczności klinicznej badanych biomarkerów wykazała, że kombinacje markerów nowotworowych CEA, CYFRA 21-1 i NSE z SAA<sub>1</sub> i glukozą podnoszą ich wartość diagnostyczną, i skuteczniej różnicują pacjentów z gruczolakorakiem od pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym niż pojedyncze biomarkery. Kombinacje IL-6, glukozy i dehydrogenazy mleczanowej oraz CEA, IL-6, SAA<sub>1</sub>, MMP-9 i mleczanu najlepiej różnicują pacjentów ze stadium zaawansowania raka płuca IIB od IIA, natomiast kombinacja CEA, IL-6 i dehydrogenazy mleczanowej jest najlepsza w różnicowaniu pacjentów ze stadium IIIA od tych ze stadium IIB. Ponadto kombinacje markerów IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP oraz hormonu hepcydyny są w stanie różnicować kobiety i mężczyzn z rakiem płuca bez niedokrwistości zarówno od pacjentów z niedokrwistością rozwiniętą po zabiegu operacyjnym, jak i pacjentów z niedokrwistością od momentu przyjęcia do szpitala z wysoką czułością i swoistością diagnostyczną oraz dużym AUC krzywej ROC.

**Wnioski:** Zaobserwowane zmiany biochemicznych wartości badanych biomarkerów sugerują, że mikrośrodowisko guza płuca różni się biochemicznie w zależności od podtypu nowotworu, co może wpływać na patogenezę oraz progresję nowotworu. Ponadto zmiany stężeń biomarkerów mikrośrodowiska płuca mają swoje podłoże genetyczne, sprawiając, że pacjenci będący nosicielami predysponującej mutacji mogą mieć większe ryzyko nasilenia procesów zachodzących w mikrośrodowisku guza płuca, a co za tym idzie większe ryzyko nowotworzenia raka płuca, a także bardziej agresywnego przebiegu choroby i gorszego przeżycia. Sprawia to, że biomarkery są istotnym źródłem informacji na temat procesów toczących się w mikrośrodowisku guza. Przeprowadzone badania użyteczności klinicznej biomarkerów są dowodem na możliwości zastosowania tych biomarkerów w praktyce klinicznej, między innymi do różnicowania pacjentów z gruczolakorakiem od pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym

oraz pacjentów ze stadiami zaawansowania raka płuca IIB od IIA oraz IIIA od IIB, które determinują podejmowane decyzje terapeutyczne. Biomarkery jak IL-6, CRP i hormon hepcydyna mogą być także z powodzeniem wdrożone do praktyki klinicznej do oceny patogenezы niedokrwistości, a także w celu wyodrębnienia grupy pacjentów operacyjnych z ryzykiem rozwinięcia powikłania pooperacyjnego, to jest niedokrwistości pooperacyjnej, która wiąże się z niekorzystnymi rokowaniami dla pacjentów z rakiem płuca.

## Summary

**Background:** Lung cancer was the leading cause of cancer death worldwide in 2020, accounting for more than 20% of all cancer deaths while also having a poor 5-year survival rate of approximately 22%. Current diagnostic tools, such as chest radiography and sputum cytology, are not sufficiently sensitive in the diagnosis of lung cancer, whereas laboratory diagnostic tumour markers (CEA, CYFRA 21-1, NSE, SCC-Ag, ProGRP) do not enable the diagnosis of lung cancer at an early stage of the disease. Epidemiological data show that there is an urgent need to find more sensitive biomarkers that could improve lung cancer detection.

Lung cancer is a chronic, multifactorial disease with a heterogeneous tumour group that hampers diagnostic and therapeutic approaches, as well as understanding of the processes that underlie its pathogenesis. The current dissertation research is based on the tumour microenvironment theory. Tumour microenvironment is a mixture of tumour cells, extracellular matrix, inflammatory microenvironment with immunological cells, proinflammatory cytokines, and growth factors that could be a source of biomarkers and fill the gap in biochemical diagnostics of currently used tumour markers. Changes in the tumour microenvironment affect cancerogenesis, tumour progression, and metastasis, as well as patients' systemic responses, such as the development of chronic inflammation or metabolic disorders. Thus, analysing changes in the lung tumour microenvironment allows for a better understanding of lung cancer pathogenesis, as well as subsequent processes in the patient's body that lead and predispose to worsening disease course, worsening treatment response, or shorter overall survival or disease-free survival.

**Objective of the study:** The objective of this dissertation was to broaden knowledge on the mechanisms underlying lung cancer pathogenesis based on tumour microenvironment theory by examining the biochemical changes' values of potential biomarkers and analysing the feasibility of incorporating them into lung cancer diagnostics. In this case, proinflammatory cytokines - IL-6, and TNF- $\alpha$ , extracellular matrix metalloproteinases - MMP-2, and MMP-9, biomarkers of glucose metabolism in cancer cells - glucose, lactate, and lactate dehydrogenase, as well as acute phase proteins - CRP, and SAA<sub>1</sub> that are indicators of the patient's systemic response to changes in the tumour microenvironment - were chosen.

**Materials and methods:** The dissertation includes observational retrospective studies in which lung cancer patients with particular histological types and stages of the

disease were compared, as well as lung cancer patients subdivided in terms of the prevalence of anaemia during hospitalization. Moreover, comparisons between the group of lung cancer patients and the control group were made. Blood samples were collected from 112 lung cancer patients, comprising 71 men and 41 women; 50 adenocarcinoma patients and 35 squamous cell carcinoma patients, prior to any surgical treatments. The control group included 100 healthy non-smokers and smokers. In the sera and plasmas of lung cancer patients were measured the concentrations of tumour markers CEA, CYFRA 21-1, NSE, and the lung cancer tumour microenvironment biomarkers IL-6, TNF- $\alpha$ , SAA<sub>1</sub>, CRP, MMP-2, MMP-9, glucose, lactate, lactate dehydrogenase, and hepcidin hormone, using EIA tests, ELISA tests, and automated clinical biochemistry systems. Whole blood samples were used for DNA genomic isolation using binding column technique, and the polymorphisms MMP-2 -735C/T and MMP-9 -1562C/T were then analysed. TIBCO Software Inc. (Palo Alto, CA, USA) (2017), Statistica, version 13 with the additional Plus Package (version 5.0.96), and a significance threshold of  $p < 0.05$  were used to perform statistical analyses of the obtained results and data from patients' hospital records.

**Results:** There were statistically significant differences in glucose concentrations between lung cancer subtypes and stages. Patients with advanced lung cancer had considerably higher levels of IL-6 and lactate dehydrogenase activity. There were statistically significant correlations between the biomarkers studied across specific lung cancer subtypes. Patients with adenocarcinoma had strong negative correlation between IL-6 and SAA<sub>1</sub>, IL-6 and MMP-2, and MMP-2 and MMP-9, as well as positive correlations between IL-6 and MMP-9, SAA<sub>1</sub> and lactate, and glucose and lactate. In squamous cell carcinoma patients, there was also a strong positive link between IL-6 and MMP-9 concentrations, as well as a positive correlation between IL-6 and glucose, SAA<sub>1</sub> and CRP, and SAA<sub>1</sub> and lactate.

There were also statistically significant differences in serum MMP-2 and MMP-9 concentrations between healthy non-smokers and smokers in the control group, with smokers having greater amounts of MMP-2 and MMP-9. Furthermore, polymorphism analysis revealed that serum concentrations of MMP-2 and MMP-9 vary statistically significantly depending on genotype, MMP-2 -735CC and -735CT, and MMP-9 -1562CC and -1562CT, respectively, in lung cancer patients with specific subtypes, as well as healthy non-smokers and smokers.

The clinical utility of the biomarkers studied revealed that combining the tumour markers CEA, CYFRA 21-1, and NSE with SAA<sub>1</sub> and glucose improves their diagnostic value and distinguishes patients with adenocarcinoma from patients with squamous cell carcinoma more effectively than single tumour markers. Combinations of IL-6, glucose, and lactate dehydrogenase, as well as CEA, IL-6, SAA<sub>1</sub>, MMP-9, and lactate dehydrogenase, can best distinguish patients with stage IIB lung cancer from those with stage IIA, whereas CEA, IL-6, and lactate dehydrogenase can distinguish patients with stage IIIA lung cancer from those with stage IIB. Furthermore, combinations of the biomarkers IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP, and hepcidin hormone can distinguish women and men with lung cancer without anaemia from both patients with anaemia developed after surgery and patients with anaemia since admission to the hospital with high diagnostic sensitivity, specificity, and AUC of the ROC curve.

**Conclusions:** The observed changes in the biochemical values of the biomarkers studied indicate that the lung tumour microenvironment vary biochemically depending on the tumour subtype, which may affect pathogenesis and tumour development. Furthermore, changes in the concentrations of lung microenvironment biomarkers have a genetic basis, which means that patients who carry a predisposing mutation are at a higher risk of intensifying the processes occurring in the lung tumour microenvironment, and thus have a higher risk of lung cancer development, as well as a more aggressive course of the disease and worsen survival outcomes. As a result, biomarkers are an essential source of information on the processes occurring in the tumour microenvironment. The research on the clinical utility of biomarkers demonstrates the possibility of using these biomarkers in clinical practice, for example, to distinguish patients with adenocarcinoma from patients with squamous cell carcinoma and patients with lung cancer stages IIB from IIA and IIIA from IIB, which determine therapeutic decisions. Biomarkers such as IL-6, CRP, and the hormone hepcidin can also be successfully used in clinical practice to assess the pathogenesis of anaemia and to identify a group of surgical patients who are at risk of developing a postoperative side effect, namely postoperative anaemia, which is associated with a poor prognosis in lung cancer patients.