

## Streszczenie

### Rola ekspresji białka YKL-40 w procesie angiogenezy w rakach gruczołu piersiowego

YKL-40 (CHI3L1) jest cząsteczką, której dokładna rola w procesie kancerogenezy jest nadal przedmiotem badań. Dotychczas uzyskane wyniki badań przemawiają za możliwością klinicznego zastosowania tego białka jako biomarkera procesu nowotworowego. Podwyższony poziom YKL-40 w surowicy pacjentów onkologicznych, korelujący z niską przeżywalnością i podwyższonym ryzykiem przerzutowania, wskazują na potencjał prognostyczny i terapeutyczny tego białka. YKL-40 wydaje się łączyć proces kancerogenezy oraz chronicznego stanu zapalnego, aczkolwiek mechanizm tego zjawiska nie został poznany. Przegląd piśmiennictwa opisującego budowę, funkcję, a także znaczenie ekspresji YKL-40 w różnych typach nowotworów, a zwłaszcza w raku gruczołu piersiowego, został przedstawiony w pracy poglądowej opublikowanej w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (Rusak i wsp., *Rola białka YKL-40 w procesie nowotworowym*, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2016).

Badania, opublikowane w pierwszej pracy oryginalnej z cyklu prac w ramach rozprawy doktorskiej, wykonano na materiale 110 inwazyjnych przewodowych raków gruczołu piersiowego (IDC ang. invasive ductal carcinoma) oraz 25 łagodnych dysplazji (NBTL ang. non-malignant breast tissue) stanowiących materiał kontrolny. Materiał został pobrany od pacjentek diagnozowanych i operowanych w Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu w latach 1999-2009 i utrwalony w postaci bloczków parafinowych. Badania molekularne przeprowadzono na fragmentach guzów IDC: n=46 (real-time PCR), n=22 (Western blot).

Na skrawkach parafinowych zostały przeprowadzone reakcje immunohistochemiczne (IHC) z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko: YKL-40 (CHI3L1); CD31, CD34 (markery znakujące komórki śródbłonka naczyń krwionośnych); VEGFA, VEGFC, VEGFD (czynniki wzrostu śródbłonka naczyniowego; markery angiogenezy w guzach nowotworowych); Ki-67 (marker proliferacji); ER, PR, HER2 (receptory: estrogenowe, progesteronowe oraz ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2; czynniki prognostyczne oraz predykcyjne w raku gruczołu piersiowego); Nogo-A, Nogo-A/B; NgBR (receptor dla Nogo-B).

Nasilenie ekspresji antygenów YKL-40, VEGFA, VEGFC, VEGFD, Nogo-A, Nogo-A/B oraz NgBR w komórkach nowotworowych oceniono z zastosowaniem półilościowej skali wg Remmele i Stegner. Ekspresję markerów CD31 oraz CD34 analizowano przy użyciu okularu Chalkley'a, wyznaczając względną powierzchnię naczyń (MVC, ang. microvessel count). Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej i korelacji z danymi kliniczno-patologicznymi. Dodatkowo, na materiale fragmentów guzów IDC o zróżnicowanym stopniu złośliwości histologicznej: G1, G2, oraz G3, oznaczono poziom mRNA YKL-40 z wykorzystaniem techniki real time-PCR (RT-PCR), a także poziom białka YKL-40 za pomocą metody Western blot.

Ocena reakcji IHC wykazała cytoplazmatyczną lokalizację ekspresji YKL-40 w komórkach nowotworowych w ponad 70% badanych przypadków IDC. Istotną statystycznie wyższą ekspresję YKL-40, w porównaniu do kontroli, odnotowano w guzach w stopniu złośliwości: G1 ( $p=0.035$ ), G2 ( $p=0.018$ ) oraz G3 ( $p<0.0001$ ), a także w guzach w stopniu złośliwości G3 w porównaniu do G2 ( $p=0.056$ ). Analiza korelacji ekspresji YKL-40 z markerami naczyniowymi wykazała istotną statystycznie dodatnią, średnią korelację z: CD31 ( $r=0.34$ ,  $p=0.0003$ ), CD34 ( $r=0.24$ ,  $p=0.012$ ) oraz VEGFD ( $r=0.24$ ,  $p=0.013$ ). Ponadto, wykazano istotną statystycznie wyższą ekspresję YKL-40 w guzach o ujemnym statusie receptorów estrogenowych (ER-) ( $p=0.041$ ) i receptorów progesteronowych (PR-) ( $p=0.014$ ). Analiza otrzymanych wyników nie wykazała zależności pomiędzy ekspresją YKL-40, a czasem całkowitego przeżycia pacjentów (OS) oraz czasem wolnym od choroby (DFS). Nie zaobserwowano również zależności ekspresji YKL-40 z pozostałymi danymi kliniczno-patologicznymi.

Wyniki otrzymane metodą RT-PCR wskazują na wyższą, bliską istotności statystycznej, ekspresję mRNA YKL-40 w guzach o stopniu G3 w porównaniu do guzów w stopniu G2 ( $p=0.067$ ) oraz brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy pozostałymi stopniami złośliwości histologicznej (G). Analiza poziomu ekspresji białka metodą Western blot potwierdziła obecność YKL-40 w guzach o stopniu złośliwości G1, G2 oraz G3, jakkolwiek nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie pomiędzy poszczególnymi stopniami złośliwości histologicznej (G). Otrzymane wyniki wskazują na potencjalną rolę YKL-40 w angiogenezie w IDC, możliwy udział YKL-40 w progresji choroby nowotworowej oraz brak prognostycznego znaczenia tego białka oznaczanego metodą IHC w zakresie całkowitego czasu przeżycia pacjentów (OS) oraz czasu wolnego od choroby (DFS). Wyniki badań zostały opublikowane na łamach czasopisma *Anticancer Research* (Rusak et al., *The*

*Role of CHI3L1 Expression in Angiogenesis in Invasive Ductal Breast Carcinoma*, Anticancer Res, 2018).

W drugiej pracy oryginalnej, opublikowanej w ramach pracy doktorskiej, przeprowadzono badania na 77 przypadkach IDC oraz 22 przypadkach NBTL, stanowiących materiał kontrolny. Materiał IDC został pobrany od pacjentek diagnozowanych i operowanych w Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu w latach 1999-2002 i utrwalony w postaci bloczków parafinowych. Reakcje IHC wykonano w celu detekcji antygenów: YKL-40, Nogo-A, Nogo-A/B, NgBR, VEGFA, VEGFC, VEGFD, ER, PR, HER2 oraz Ki-67. Nasilenie ekspresji badanych antygenów oceniono z zastosowaniem półilościowej skali wg Remmele i Stegner. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej i korelacji z danymi kliniczno-patologicznymi.

Ocena reakcji IHC wykazała cytoplazmatyczną lokalizację ekspresji YKL-40, Nogo-A, Nogo-A/B, NgBR oraz markerów angiogenezy: VEGFA, VEGFC, VEGFD w komórkach nowotworowych badanych guzów IDC. Ponad 30% badanych przypadków charakteryzowało się wysokim poziomem immunoekspresji YKL-40. Analiza reakcji IHC pokazała istotną statystycznie dodatnią, umiarkowaną korelację ekspresji YKL-40 z Nogo-A ( $r=0.474$ ,  $p>0.0001$ ) oraz dodatnią, niską korelację ekspresji Nogo-A i VEGFC ( $r=0.280$ ,  $p=0.013$ ). Co więcej, zaobserwowano bliską istotności statystycznej dodatnią, niską korelację ekspresji Nogo-A z VEGFA ( $r=0.211$ ,  $p=0.065$ ) i VEGFD ( $r=0.192$ ,  $p=0.094$ ). Stwierdzono także brak istotnych statystycznie korelacji ekspresji YKL-40 z Nogo-A/B oraz z NgBR. Nie odnotowano także zależności ekspresji Nogo-A z czynnikami kliniczno-patologicznymi, w tym z OS i DFS. Uzyskane rezultaty wskazują na możliwy udział YKL-40 i Nogo-A w procesie angiogenezy w inwazyjnym przewodowym raku gruczołu piersiowego. Powyższe wyniki opublikowano w czasopiśmie Anticancer Research (Rusak et al., *Correlation of Expression of CHI3L1 and Nogo-A and their Role in Angiogenesis in Invasive Ductal Breast Carcinoma*, Anticancer Res, 2019).

## Summary

### **The role of YKL-40 protein expression in angiogenesis in breast cancers**

YKL-40 (CHI3L1) is a molecule which exact role in the process of carcinogenesis is still under investigation. Obtained result indicate the possibility of clinical use of this protein as a biomarker of the cancerous process. Increased level of YKL-40 in oncological patient's serum, correlating with poorer survival and elevated risk of metastasis, indicate the prognostic and therapeutic potential of this protein. YKL-40 seems to combine the process of carcinogenesis and chronic inflammation, although the mechanism of this phenomenon is still unclear. A review of the literature describing the structure, function and expression of YKL-40 in various types of tumors, especially in breast cancer, was presented in a review article published in *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* (Rusak et al., *The role of YKL-40 in a cancerous process*, Postepy Hig Med Dosw, 2016).

The research, published in the first original article from the series of articles within the doctoral dissertation, was performed on 110 invasive ductal breast carcinomas (IDC) and 25 non-malignant breast tissue lesions (NMLT) as the control material. The material was collected from the patients diagnosed and operated in the Lower Silesian Oncology Center in Wrocław between 1999-2009 and embedded in paraffin blocks. Molecular studies were performed on fragments of IDC tumors: n = 46 (real-time PCR), n = 27 (Western blot).

Immunohistochemical (IHC) reactions were performed on paraffin sections using antibodies directed against: YKL-40 (CHI3L1), CD31, CD34 (markers of vascular endothelial cells), VEGFA, VEGFC, VEGFD (vascular endothelial growth factors; markers of angiogenesis in cancer), Ki67 (marker of proliferation), ER, PR, HER-2 (receptors of estrogen, progesterone and human epidermal growth factor 2; prognostic and predictive factors in breast cancer), Nogo-A, Nogo-A/B, NgBR (Nogo-B receptor).

The expression of YKL-40, VEGFA, VEGFC, VEGFD, Nogo-A, Nogo-A/B and NgBR antigens in tumor cells was evaluated using a semi-quantitative Remmele and Stegner scale. Expression of the CD31 and CD34 markers was analyzed using a Chalkley eyepiece, determining the relative microvessel count (MVC). The obtained results were subjected to statistical analysis and correlation with clinico-pathological data. Additionally, on the material of IDC tumor fragments with varying degrees of histological malignancy: G1, G2, and G3,

the YKL-40 mRNA level was determined using real time-PCR (RT-PCR), as well as the level of YKL-40 protein using the Western blot method.

Analysis of the IHC reactions showed the cytoplasmic localization of the YKL-40 expression in cancer cells in over 70% of IDC cases. A statistically significant higher expression of YKL-40, compared to controls, was noted in tumors of histological grade of malignancy: G1 ( $p = 0.035$ ), G2 ( $p = 0.018$ ) and G3 ( $p < 0.0001$ ), as well as in tumors of grade of malignancy G3 compared to G2 ( $p = 0.056$ ). Analysis of the correlation of YKL-40 expression with vascular markers showed statistically significant positive, moderate correlation with: CD31 ( $r = 0.34$ ,  $p = 0.0003$ ), CD34 ( $r = 0.24$ ,  $p = 0.012$ ) and VEGFD ( $r = 0.24$ ,  $p = 0.013$ ). In addition, statistically significant higher YKL-40 expression was observed in tumors with a negative status of estrogen (ER-) ( $p=0.041$ ) and progesterone (PR-) receptors ( $p=0.014$ ). Analysis of the obtained results did not show the relationship between the expression of YKL-40 and the patients' overall survival (OS) and disease-free time (DFS). There was also no correlation between YKL-40 expression and other clinico-pathological data.

The results obtained by RT-PCR indicate a higher, close to statistical significance, expression of mRNA YKL-40 in G3 tumors compared to G2 tumors ( $p = 0.067$ ) and no statistically significant difference between the remaining histological grades (G). Analysis of the protein expression level by Western blot confirmed the presence of YKL-40 in tumors of G1, G2 and G3 histological grade, although no statistically significant differences were observed between the individual histological (G) grade. The obtained results indicate the potential role of YKL-40 in angiogenesis in IDC, the possible involvement of YKL-40 in the progression of cancer and the lack of prognostic significance of this protein determined by the IHC method in terms of patients' overall survival (OS) and disease-free time (DFS). The results of the research were published in the journal *Anticancer Research* (Rusak et al., *The Role of CHI3L1 Expression in Invasive Ductal Breast Carcinoma, Anticancer Res*, 2018).

In the second original paper published as part of the doctoral dissertation, the study was conducted on 77 IDC cases and 22 NBTL cases as the control material. IDC material was collected from patients diagnosed and operated in the Lower Silesian Oncology Center in Wrocław between 1999–2002 and embedded in paraffin blocks. IHC reactions were performed to detect the antigens: YKL-40, Nogo-A, Nogo-A/B, NgBR, VEGFA, VEGFC, VEGFD, ER, PR, HER2 and Ki-67. The intensity of the expression of the studied antigens

was evaluated using a semi-quantitative scale according to Remmele and Stegner. The obtained results were subjected to statistical analysis and correlation with clinico-pathological data.

Analysis of the IHC reaction showed the cytoplasmic location of expression of YKL-40, Nogo-A, Nogo-A/B, NgBR and angiogenesis markers: VEGFA, VEGFC, and VEGFD in the cancer cells of the IDC tumors. Over 30% of examined cases were characterized by a high level of YKL-40 immuno-expression. Analysis of the IHC reaction showed statistically significant positive, moderate correlation of the YKL-40 expression with Nogo-A ( $r=0.474$ ,  $p>0.0001$ ) and positive, low correlation of Nogo-A and VEGFC expression ( $r=0.280$ ,  $p=0.013$ ). Moreover, a close to statistical significance, positive and low correlation between expression of Nogo-A and VEGFA ( $r=0.211$ ,  $p=0.065$ ) and VEGFD ( $r=0.192$ ,  $p=0.094$ ) was observed. There was no statistically significant correlation of YKL-40 expression with Nogo-A/B and NgBR. There was also no correlation between Nogo-A expression and clinico-pathological factors, including OS and DFS. The obtained results indicate the possible participation of YKL-40 and Nogo-A in the process of angiogenesis in invasive ductal breast carcinoma. The above results were published in the journal *Anticancer Research* (Rusak et al., *Correlation of Expression of CHI3L1 and Nogo-A and their Role in Angiogenesis in Invasive Ductal Breast Carcinoma*, *Anticancer Res*, 2019).