



**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 Wrzeszcz**

**Ocena wartości prognostycznej wybranych czynników  
hemostatycznych oraz zmiana ich stężenia w odpowiedzi na  
zastosowane leczenie uzupełniające u pacjentek z inwazyjnym  
rakiem piersi**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu**

**Promotor:  
dr hab. n. med. Barbara Ciastek**

**Bydgoszcz 2024 r.**

*„W życiu przydaje się mentor, nauczyciel. Ktoś życzliwy, kto popchnie nas nawet leciutko, ale we właściwym kierunku. Puknie palcem w mapę i wskaże drogę, której początku sami nie umieliśmy odnaleźć.”*

*— Andrzej Pilipiuk*

*Niech te słowa będą wyrazem mojej głębokiej wdzięczności wobec dr hab. n. med. Barbary Ciastek za nieustające wsparcie, cenne wskazówki merytoryczne oraz trud włożony w obecny całościowy kształt niniejszej rozprawy doktorskiej. W sposób szczególny pragnę podziękować dr hab. n. med. Barbarze Ciastek za przekazaną mądrość oraz inspirujące dyskusje, które były kluczem do spełniania moich marzeń.*

*Dziękuję również mojej rodzinie za nieocenione wsparcie i motywację. W szczególności dziękuję mojemu mężowi za pomoc oraz nieustanną wiarę we mnie. Niniejszą pracę pragnę zadedykować mojej córce Michalinie.*

# SPIS TREŚCI

|   |    |
|---|----|
| Wykaz skrótów .....   | 6  |
| I. Wstęp.....   | 9  |
| 1. Hemostaza .....  | 9  |
| 1.1. Definicja hemostazy .....                              | 9  |
| 1.2. Etapy procesu hemostazy .....                          | 9  |
| 1.3. Hemostaza pierwotna .....                              | 11 |
| 1.3.1. Hemostaza naczyniowa .....                           | 11 |
| 1.3.2. Hemostaza płytkowa.....                              | 13 |
| 1.4. Hemostaza wtórna .....                                 | 15 |
| 1.4.1. Czynniki krzepnięcia .....                           | 16 |
| 1.4.2. Kaskadowy model krzepnięcia .....                    | 17 |
| 1.4.3. Nowa koncepcja teorii krzepnięcia .....              | 19 |
| 1.5. Fibrynliza .....                                       | 22 |
| 1.6. Regulacja procesu hemostazy .....                      | 24 |
| 1.6.1. Regulacja procesu krzepnięcia .....                  | 25 |
| 1.6.2. Regulacja procesu fibrynolizy .....                  | 26 |
| 2. Rak piersi .....   | 28 |
| 2.1 Definicja .....   | 28 |
| 2.2. Epidemiologia raka piersi w Polsce i na świecie .....  | 28 |
| 2.3. Patogeneza raka piersi.....                            | 30 |
| 2.4. Czynniki ryzyka raka piersi .....                      | 33 |
| 2.5. Klasyfikacja raka piersi .....                         | 34 |
| 2.5.1. Klasyfikacja histologiczna .....                     | 35 |
| 2.5.2. Ocena stopnia złośliwości histologicznej.....        | 36 |
| 2.5.3. Klasyfikacja stopnia zaawansowania klinicznego ..... | 37 |
| 2.5.4. Klasyfikacja molekularna .....                       | 39 |
| 2.6. Leczenie raka piersi .....                             | 43 |
| 2.6.1. Zabieg chirurgiczny .....                            | 43 |
| 2.6.2. Radioterapia .....                                   | 46 |
| 2.6.3. Chemioterapia .....                                  | 46 |
| 2.6.4. Hormonoterapia .....                                 | 48 |
| 2.6.5. Terapia celowana .....                               | 50 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.6.6. Immunoterapia .....  | 51  |
| 3. Zaburzenia procesu hemostazy w nowotworze piersi .....                     | 53  |
| 3.1. Rola płytek w przebiegu raka piersi .....                                | 54  |
| 3.2. Rola układu krzepnięcia w przebiegu raka piersi .....                    | 55  |
| 3.3. Rola czynnika tkankowego w promowaniu stanu prozakrzepowego .....        | 56  |
| 3.3.1. Bezpośrednia rola czynnika tkankowego w progresji raka piersi .....    | 57  |
| 3.3.2. Pośrednia rola czynnika tkankowego w progresji raka piersi .....       | 59  |
| 3.4. Rola inhibitora szlaku czynnika tkankowego w przebiegu raka piersi ..... | 61  |
| 3.5. Rola układu fibrynolizy w progresji raka piersi .....                    | 62  |
| 3.6. Powikłania leczenia przeciwnowotworowego .....                           | 69  |
| II. Cel pracy .....   | 71  |
| III. Cykl publikacji .....  | 72  |
| IV. Podsumowanie .....  | 124 |
| V. Wnioski .....  | 126 |
| VI. Streszczenia .....  | 128 |
| VII. Bibliografia .....   | 132 |
| VIII. Spis rycin .....  | 149 |
| IX. Spis tabel .....  | 150 |
| X. Zgoda komisji bioetycznej .....  | 151 |
| XI. Oświadczenia o współautorstwie .....                                      | 154 |

## Wykaz skrótów

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>ABP-280</b>                 | białko wiążące aktynę 280 (ang. <i>actin-binding protein 280</i> )                           |
| <b>ADP-aza</b>                 | adenozyno-5'-difosfataza (ang. <i>adenosine-5'-diphosphatase</i> )                           |
| <b>AI</b>                      | inhibitory aromatazy (ang. <i>aromatase inhibitors</i> )                                     |
| <b>ANG-2</b>                   | angiopoetyna 2 (ang. <i>angiopoietin 2</i> )   |
| <b>APC</b>                     | aktywowane białko C (ang. <i>activated protein C</i> )                                       |
| <b>AT</b>                      | antytrombina (ang. <i>antithrombin</i> )   |
| <b>ATP</b>                     | adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine-5'-triphosphate</i> )                            |
| <b>BCS</b>                     | chirurgia oszczędzająca pierś (ang. <i>breast-conserving surgery</i> )                       |
| <b>bFGF</b>                    | zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>basic fibroblast growth factor</i> )          |
| <b>CAT</b>                     | zakrzepica związana z rakiem (ang. <i>cancer-associated thrombosis</i> )                     |
| <b>CSF-1</b>                   | czynnik stymulujący kolonie 1 (ang. <i>colony stimulating factor 1</i> )                     |
| <b>CTCs</b>                    | krążące komórki nowotworowe (ang. <i>circulating tumor cells</i> )                           |
| <b>ECs</b>                     | komórki śródbłonna naczyniowego (ang. <i>endothelial cells</i> )                             |
| <b>EGF</b>                     | naskórkowy czynnik wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor</i> )                            |
| <b>EGFR</b>                    | receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> )       |
| <b>EMT</b>                     | przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i> )          |
| <b>EVs</b>                     | pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. <i>extracellular vesicles</i> )                           |
| <b>FDPs</b>                    | produkty degradacji fibryny (ang. <i>fibrin degradation products</i> )                       |
| <b>FGF</b>                     | czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor</i> )                         |
| <b>FISH</b>                    | fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (ang. <i>fluorescent in situ hybridization</i> )        |
| <b>G</b>                       | stopień złośliwości histologicznej (ang. <i>grade</i> )                                      |
| <b>GRO-<math>\alpha</math></b> | onkogen związany ze wzrostem alfa (ang. <i>growth-related oncogene-alpha</i> )               |
| <b>HER2</b>                    | receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (ang. <i>human epidermal receptor 2</i> ) |
| <b>HGF</b>                     | czynnik wzrostu hepatocytów (ang. <i>hepatocyte growth factor</i> )                          |
| <b>HIF-1</b>                   | czynnik indukowany hipoksją 1 (ang. <i>hypoxia-inducible factor 1</i> )                      |
| <b>HMWK</b>                    | wielkocząsteczkowy kininogen (ang. <i>high-molecular weight kininogen</i> )                  |

|                |  |
|----------------|--|
| <b>IGF-1</b>   | insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. <i>insulin-like growth factor 1</i> )  |
| <b>IHC</b>     | techniki immunohistochemiczne (ang. <i>immunohistochemistry</i> )  |
| <b>IL-8</b>    | interleukina 8 (ang. <i>interleukin 8</i> )  |
| <b>ILC</b>     | inwazyjny rak zrazikowy (ang. <i>invasive lobular carcinoma</i> )  |
| <b>JNK</b>     | kinaza c-Jun N-terminalna (ang. <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )   |
| <b>LBSs</b>    | miejsca wiązania lizyny (ang. <i>lysine-binding sites</i> )  |
| <b>LRP1</b>    | białko 1 związane z receptorem lipoproteiny niskiej gęstości (ang. <i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i> ) |
| <b>MAPKs</b>   | receptor aktywowany proteazami 2 (ang. <i>protease-activated receptor 2</i> )  |
| <b>MMPs</b>    | metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (ang. <i>matrix metalloproteinases</i> )  |
| <b>MMR</b>     | system naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych (ang. <i>mismatch repair</i> )  |
| <b>MRM</b>     | zmodyfikowana radykalna mastektomia (ang. <i>modified-radical mastectomy</i> )   |
| <b>MT-MMPs</b> | metaloproteinazy błonowej macierzy pozakomórkowej (ang. <i>membrane-type matrix metalloproteinases</i> )                       |
| <b>NK</b>      | komórki NK (ang. <i>natural killers</i> )  |
| <b>NO</b>      | tlenek azotu (ang. <i>nitric oxide</i> )   |
| <b>NSM</b>     | mastektomia z zaoszczędzeniem kompleksu otoczka–brodawka (ang. <i>nipple-sparing mastectomy</i> )                              |
| <b>NST</b>     | inwazyjny rak bez specjalnego typu (ang. <i>invasive carcinoma of no special type</i> )  |
| <b>PAI-1</b>   | inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (ang. <i>plasma activator inhibitor type 1</i> )                                      |
| <b>PAP</b>     | kompleks plazmina-antyplazmina (ang. <i>plasmin-antiplasmin complex</i> )  |
| <b>PAR-1</b>   | receptor aktywowany proteazami 1 (ang. <i>protease-activated receptors 1</i> )   |
| <b>PAR-2</b>   | receptor aktywowany proteazami 2 (ang. <i>protease-activated receptor 2</i> )  |
| <b>PARs</b>    | receptory aktywowane przez proteazy (ang. <i>protease-activated receptors</i> )  |
| <b>PD-1</b>    | receptor programowanej śmierci (ang. <i>programmed death receptor 1</i> )  |
| <b>PDGF</b>    | płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. <i>platelet-derived growth factor</i> )   |
| <b>PGI2</b>    | prostacyklina (ang. <i>prostacyclin 2</i> )  |
| <b>PKB</b>     | kinaza białkowa B/Akt (ang. <i>protein kinase B</i> )  |
| <b>PSGL-1</b>  | glikoproteinowy ligand 1 P-selektyny (ang. <i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i> )   |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>SERM</b>                    | selektywne modulatory receptora estrogenowego (ang. <i>selective estrogen receptor modulators</i> )             |
| <b>TAFI</b>                    | inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (ang. <i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i> )            |
| <b>TCIPA</b>                   | agregacja płytek krwi indukowana komórkami nowotworowymi (ang. <i>tumor cell-induced platelet aggregation</i> ) |
| <b>TF</b>                      | czynnik tkankowy (ang. <i>tissue factor</i> )   |
| <b>TFPI</b>                    | inhibitor szlaku czynnika tkankowego (ang. <i>tissue factor pathway inhibitor</i> )                             |
| <b>TGF-<math>\alpha</math></b> | transformujący czynnik wzrostu $\alpha$ (ang. <i>transforming growth factor alpha</i> )                         |
| <b>t-PA</b>                    | tkankowy aktywator plazminogenu (ang. <i>tissue plasminogen activator</i> )                                     |
| <b>TXA2</b>                    | tromboksan A2 (ang. <i>thromboxane A2</i> )   |
| <b>u-PA</b>                    | aktywator plazminogenu typu urokinazy (ang. <i>urokinase-type plasminogen activator</i> )                       |
| <b>VEGF</b>                    | czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> )                       |
| <b>VTE</b>                     | żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (ang. <i>venous thromboembolism</i> )   |
| <b>vWF</b>                     | czynnik von Willebranda (ang. <i>von Willebrand factor</i> )  |
| <b>WHO</b>                     | Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i> )   |
| <b>XL-FDPs</b>                 | produkty degradacji sieciującej fibryny (ang. <i>cross-linking fibrin degradation products</i> )                |
| <b>ZPI</b>                     | inhibitor proteazy związany z białkiem Z (ang. <i>protein Z-dependent protease inhibitor</i> )                  |



# I. Wstęp

## 1. Hemostaza

### 1.1. Definicja hemostazy

Hemostaza, wywodząca się z języka greckiego od słowa *haimostasis* (*haimo-* oznacza krew, *a-stasis* zatrzymanie) w dosłownym tłumaczeniu definiowana jest jako zatrzymanie krwawienia [1]. Hemostaza jest fundamentalnym procesem uczestniczącym w utrzymaniu krążenia i jest wynikiem złożonej równowagi pomiędzy krzepnięciem a fibrynolizą [2]. Obejmuje ściśle regulowane mechanizmy komórkowe i biochemiczne mające na celu zapewnienie płynności przepływu krwi w warunkach fizjologicznych oraz zapobieganie wynaczynieniu w przypadku zaburzenia integralności naczyń krwionośnych [3]. Hemostaza stanowi pierwszy etap gojenia się rany w wyniku natychmiastowej reakcji organizmu na krwawienie w miejscu uszkodzenia ściany naczyniowej [4, 5]. W proces hemostazy zaangażowane są cztery główne elementy: śródbłonek naczyniowy, płytki krwi, układ krzepnięcia oraz układ fibrynolityczny [6].

### 1.2. Etapy procesu hemostazy

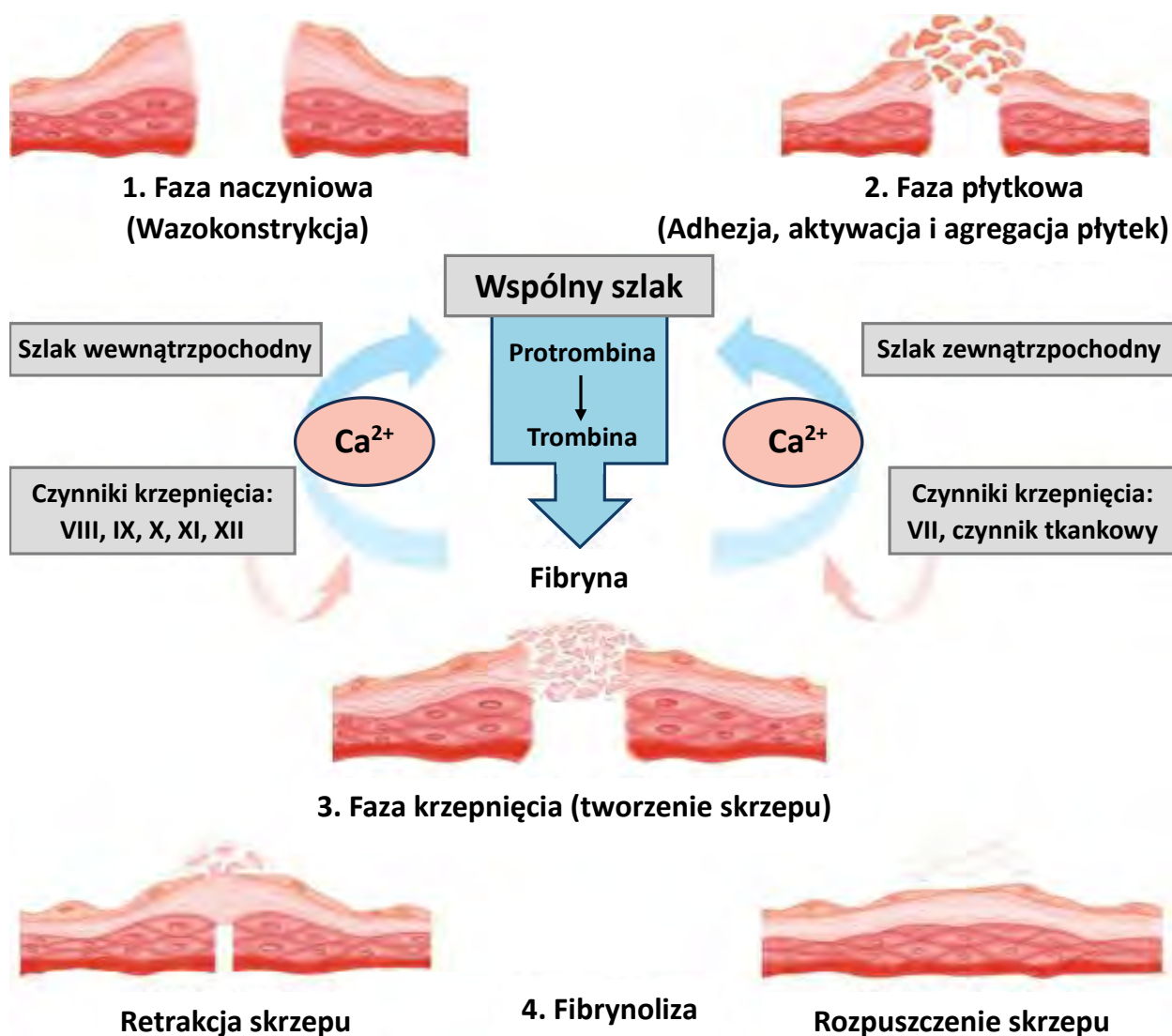
Organizm ludzki posiada doskonale mechanizmy kontrolujące krwawienie w przypadku urazu. Zrozumienie tych podstawowych procesów fizjologicznych ma kluczowe znaczenie w identyfikacji i diagnozowaniu zaburzeń krzepnięcia, a ich utrzymanie zależy od układu hemostazy [7]. Prawidłową odpowiedź hemostatyczną można podzielić na trzy główne fazy, na które składają się sześć odrębnych, kolejno postępujących po sobie etapów [8].

**Tabela 1.** Fizjologiczne szlaki trzech różnych typów hemostazy [8].

| Typ hemostazy            | Mechanizm   |
|--------------------------|---|
| Hemostaza pierwotna      | Wazokonstrykcja<br>Tworzenie czopu płytkowego                 |
| Hemostaza wtórna         | Aktywacja kaskady krzepnięcia<br>Tworzenie stabilnego skrzepu |
| Hemostaza trzeciorzędowa | Aktywacja plazminogenu<br>Rozpuszczenie skrzepu               |

W kontekście powyższego, hemostaza jest procesem trójfazowym, który obejmuje hemostazę pierwotną (tworzenie czopu płytkowego), wtórną (tworzenie stabilizowanego skrzepu fibrynowego poprzez kaskadę krzepnięcia) oraz trzeciorzędową (rozpuszczanie skrzepu przez fibrylizację) [9]. Procesy te są ze sobą wzajemnie powiązane poprzez mechanizmy zapewniające zbilansowaną hemostazę [10].

W obrębie wyżej wymienionych faz istnieje sześć głównych, sekwencyjnych etapów hemostazy. Należą do nich: (1) skurcz naczyń krwionośnych, (2) utworzenie czopu płytkowego, (3) aktywacja układu krzepnięcia, (4) utworzenie stabilnego skrzepu, (5) aktywacja plazminogenu oraz (6) fibrylizacja. Każdy z wyżej wymienionych procesów ma tendencję do aktywacji w określonej kolejności przy jednoczesnym zachowaniu ścisłej interakcji między poszczególnymi etapami [8, 9].



Rycina 1. Fizjologia procesu hemostazy (w modyfikacji własnej) [9].

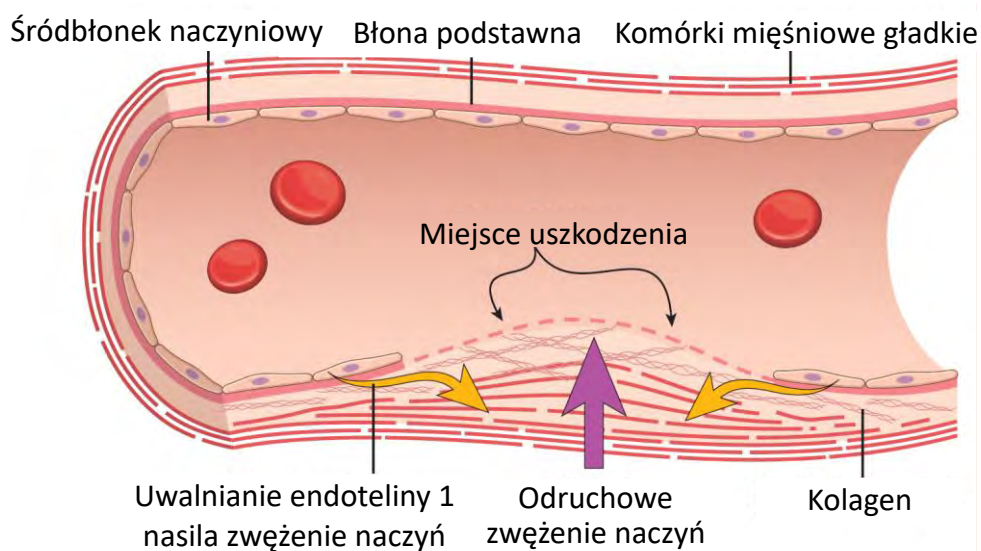
### 1.3. Hemostaza pierwotna

Hemostaza pierwotna to pierwszy etap aktywacji układu hemostazy. Składa się z fazy naczyniowej oraz fazy płytkowej, ujawniając w ten sposób prokoagulacyjne działanie naczyń krwionośnych i płytek krwi. Zasadniczym celem hemostazy pierwotnej jest utworzenie słabego i nietrwałego pierwotnego czopu płytkowego, prowadząc w ten sposób do wstępnego zatrzymania krwawienia [10–12].

#### 1.3.1. Hemostaza naczyniowa

Śródbłonek naczyniowy wyściełający światło naczyń krwionośnych stanowi dynamiczną granicę między przepływającą krwią a ścianą naczynia krwionośnego. W warunkach fizjologicznych swobodny przepływ krwi utrzymywany jest dzięki skomplikowanej równowadze pomiędzy czynnikami związanymi ze śródbłonkową wyściółką naczynia, czynnikami koagulacyjnymi, antykoagulacyjnymi oraz płytkami krwi. W nienaruszonym układzie naczyniowym komórki śródbłonka naczyniowego (ECs, ang. *endothelial cells*) wydzielają szereg substancji aktywnych, których działanie ma celu utrzymanie procesu krzepnięcia w stanie spoczynku. Kluczowymi mediatorami wydzielanymi przez komórki śródbłonka naczyniowego są adenozyne, prostacyklina (PGI<sub>2</sub>, ang. *prostacyclin 2*) oraz tlenek azotu (NO, ang. *nitric oxide*), które charakteryzują się silnym działaniem przeciwplatekcyjnym poprzez blokowanie i hamowanie zdolności płytek krwi do adhezji i agregacji. Dodatkowo, powierzchnia śródbłonka naczyniowego pokryta jest warstwą proteoglikanów, składającą się głównie z heparyny, siarczanu heparanu i siarczanu dermatanu, które nadają wewnętrznej ścianie naczynia ujemny ładunek powierzchniowy. Dzięki temu następuje elektrostatyczne odpychanie innych, również obdarzonych ładunkiem ujemnym, molekuł krążących we krwi (np. płytek krwi, czynników krzepnięcia), co utrudnia ich kontakt ze ścianą naczynia. Śródbłonek naczyniowy wykazuje również na swojej powierzchni ekspresję cząsteczek o charakterze antykoagulacyjnym. Najważniejsze z perspektywy fizjologii hemostazy naczyniowej to trombomodulina, uczestnicząca w hamowaniu układu krzepnięcia i regulacji fibrynolizy oraz adenozyne-5'-difosfataza (ADP-aza, ang. *adenosine-5'-diphosphatase*) działająca inaktywująco na płytki krwi. Aktywność biologiczna śródbłonka naczyniowego odgrywa zatem olbrzymią rolę w zapewnieniu równowagi pomiędzy mechanizmami pro- i antykoagulantnymi [10, 13–16].

W sytuacji przerwania integralności łożyska naczyniowego zainicjowany zostaje proces krzepnięcia krwi, mający na celu zapobieganie utracie krwi [10]. Odruchową reakcją na uraz jest obkurczenie i zwężenie uszkodzonego naczynia krwionośnego (wazokonstrykcja). Wazokonstrykcja stanowi pierwszy etap hemostazy w odpowiedzi na zaburzenie ciągłości naczynia krwionośnego. Jest to proces przejściowy, które minimalizuje przepływ krwi do dotkniętego obszaru i jest zależny od autonomicznego odruchu neurogennego i mediatorów wazoaktywnych [9, 15]. Autonomiczny odruch neurogeny jest natychmiastowym bodźcem inicjowanym przez nocycyptory w ścianie naczyń krwionośnych, pobudzającym skurcz mięśni gładkich wokół uszkodzonego naczynia przez współczulny układ nerwowy [17]. Poza tym, w momencie uszkodzenia naczynia krwionośnego do krwi uwalniane są naturalne przekaźniki komórkowe o charakterze ściągającym. Do kluczowych mediatorów wazoaktywnych zalicza się tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>, ang. *thromboxane A<sub>2</sub>*) oraz epinefrynę, które silnie stymulują skurcz lokalnych mięśni gładkich i małych tętniczek [18]. Tromboksan A<sub>2</sub> jest wytwarzany lokalnie w miejscu urazu w wyniku uwolnienia kwasu arachidonowego z błon płytek krwi [9]. Z kolei w procesie zwężenia naczyń pośredniczy głównie endotelina 1, która jest silnym związkiem zwężającym naczynia syntetyzowanym przez uszkodzone komórki śródbłonna naczyniowego. Dodatkowo, uszkodzony śródbłonek naczyniowy odsłania kolagen podśródbłonkowy, czynnik von Willebranda (vWF, ang. *von Willebrand factor*) oraz uwalnia adenozy-no-5'-trifosforan (ATP, ang. *adenosine-5'-triphosphate*) i mediatory stanu zapalnego. Połączenie ekspozycji na vWF, kolagen podśródbłonkowy, ATP oraz mediatory stanu zapalnego stanowi bezpośrednie przejście do drugiej fazy pierwotnej hemostazy, czyli hemostazy płytkowej [19].



**Rycina 2.** Udział ściany naczyniowej w procesie hemostazy (w modyfikacji własnej) [20].

### **1.3.2. Hemostaza płytkowa**

Kolejną komponentą hemostazy uruchamianą po przerwaniu ciągłości ściany naczynia krwionośnego są płytki krwi. Płytki krwi, inaczej zwane trombocytami, w układzie hemostazy pierwotnej odrywają podwójną rolę. Po pierwsze, uczestniczą w formowaniu pierwotnego czopu hemostatycznego, zanim zostaną zainicjowane szlaki kaskady krzepnięcia. Po drugie, poprzez zdolność do sekrecji substancji biologicznie czynnych znajdujących się w ziarnistościach oraz obecność na swojej powierzchni integralnych glikoprotein obdarzonych funkcją receptorową, trombocyty pośredniczą w regulacji procesu hemostazy [10, 21].

Udział płytek krwi w tworzeniu czopu pierwotnego można podzielić na trzy, częściowo zachodzące na siebie etapy: adhezję, aktywację oraz agregację płytek krwi [22].

#### **Adhezja płytek krwi**

Adhezja płytek krwi jest złożonym procesem, polegającym na przyleganiu płytek krwi do miejsca uszkodzonego śródbłonka naczyniowego. Mechanizm ten jest wspierany poprzez ścisłe interakcje pomiędzy receptorami powierzchniowymi oraz białkami adhezyjnymi. Ten złożony układ cząsteczek adhezyjnych i ligandów umożliwia płytkom wiązanie się z wieloma różnymi elementami komórkowymi i strukturalnymi [8, 22, 23].

Uszkodzenie naczynia powoduje odsłonięcie elementów podśródbłonkowej macierzy zewnątrzkomórkowej, do której szybko przylegają płytki krwi w celu ograniczenia krwawienia oraz zainicjowania procesu gojenia tkanek. Macierz zewnątrzkomórkowa bogata jest w makrocząsteczki o właściwościach adhezyjnych, takich jak kolagen, czynnik von Willebranda, laminina, fibronektyna i trombospondyna, które służą jako ligandy dla powierzchniowych receptorów płytek krwi. W szczególności, spośród wyżej wymienionych substratów podśródbłonkowych, najsilniejszym mediatorem adhezji płytek krwi jest trombogenny kolagen włóknisty typu I i III ze względu na silny potencjał do aktywacji płytek krwi oraz wysokie powinowactwo do vWF. W warunkach przepływu krwi o wysokim module ścinania, typowym dla drobnych naczyń krwionośnych, odsłonięty kolagen w pierwszej kolejności reaguje i wiąże się z podśródbłonkowym vWF. Po przyłączeniu, czynnik von Willebranda dokonuje zmiany konformacyjnej umożliwiającej wiązanie płytek krwi. Specyficzne wiązanie płytek krwi z czynnikiem von Willebranda odbywa się za pośrednictwem kompleksu receptorowego GPIb-IX-V na powierzchni płytek krwi poprzez swoistą interakcję

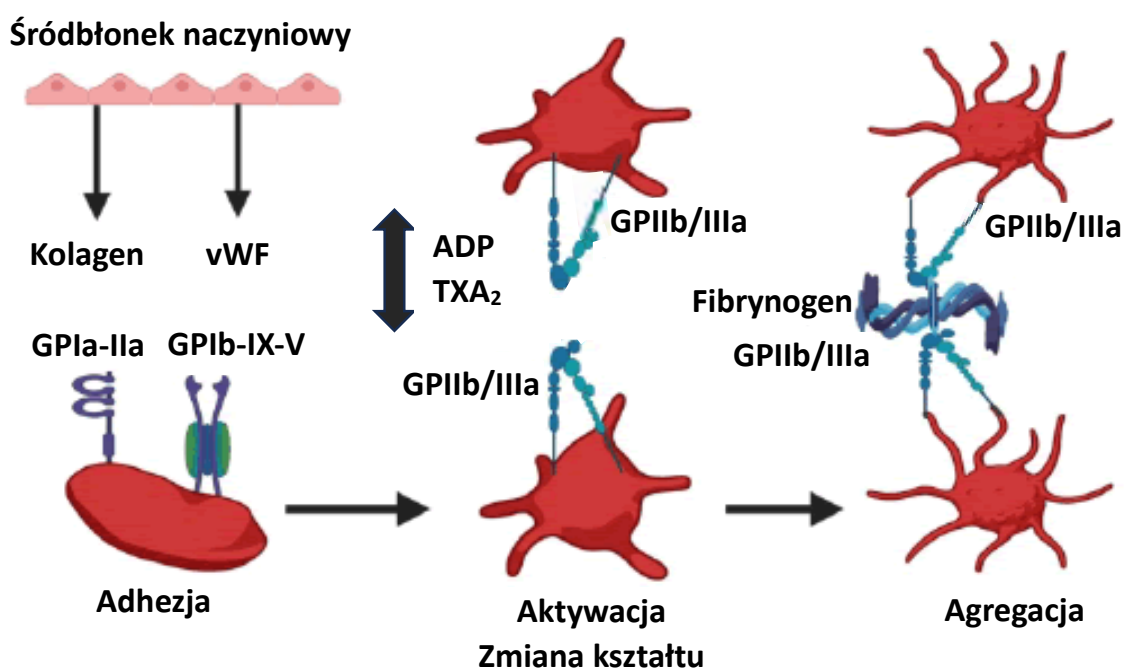
między GPIb $\alpha$  i domeną A1 vWF. W drobnych naczyniach włosowatych czynnik von Willebranda stanowi więc niezbędne spoiwo między płytkami i białkami macierzy pozakomórkowej. Natomiast przy niskim module ścinania, charakterystycznym dla przepływu krwi w dużych naczyniach krwionośnych, płytki wiążą się bezpośrednio do białek tkanki łącznej. Istotne znaczenie mają receptory: GPIa-IIa oraz GPVI wiążący kolagen, GPIc-IIa wiążący fibronektynę i lamininę oraz integryna  $\alpha\text{v}\beta_3$  wiążąca witronektynę. W ten sposób w procesie adhezji płytek krwi, bezpośrednio lub za pośrednictwem kofaktorów, formowana jest monowarstwa płytek krwi na powierzchni uszkodzonego naczynia krwionośnego [21, 24–26].

### **Aktywacja płytek krwi**

Aktywacja trombocytów następuje w chwili ich adhezji do podśródbłonkowej macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez oddziaływanie kolagenu ze specyficznymi receptorami płytkowymi GPVI oraz GPIa/IIa. Związane płytki krwi ulegają bardzo specyficznym zmianom za pośrednictwem licznych substancji o charakterze agonistów, takich jak ADP, tromboksan A<sub>2</sub>, kolagen oraz trombina. Najsilniejszym fizjologicznym agonistą płytkowym jest trombina. Podczas aktywacji dochodzi do zmiany kształtu płytek krwi z dyskooidalnego na kulisty wraz z wytworzeniem licznych wypustek, tzw. pseudopodiów, zwiększających powierzchnię płytek oraz umożliwiających łączenie się z innymi płytkami. Jest to niezwykle szybki proces polegający na reorganizacji architektury cytoszkieletu. Zmiany te warunkują dalszą sekwencję zdarzeń indukujących degranulację różnych związków z ziarnistości płytek. Aktywacja płytek krwi uruchamia wewnątrzpłytkowe szlaki sygnałowe inicjujące uwolnienie substancji biologicznie aktywnych z ziarnistości  $\alpha$  oraz ziarnistości gęstych  $\delta$  płytek, między innymi ADP, tromboksan, fibrynogen oraz serotoninę. Po uwolnieniu mediatorzy te wiążą się ze specyficznymi receptorami na powierzchni płytek krwi i działają jako dodatkowe aktywatory płytek krwi. W ten sposób poprzez mechanizmy autokrynne i parakrynne wzmacniają i amplifikują proces aktywacji płytek krwi oraz rekrutują kolejne, nowe płytki krwi do procesu hemostatycznego [21, 22, 27–31].

## Agregacja płytek krwi

Aktywacji płytek krwi towarzyszy ich agregacja, czyli łączenie się płytek w większe konglomeraty. Wzajemne łączenie się płytek jest możliwe dzięki obecności na ich powierzchni receptora dla fibrynogenu GPIIb-IIIa. Aktywowany receptor GPIIb-IIIa wiąże fibrynogen, za pośrednictwem którego dochodzi do utworzenia molekularnych mostków pomiędzy agregującymi płytkami krwi. Usieciowane poprzez fibrynogen płytki krwi tworzą płytkowy czop pierwotny [29, 32].



Rycina 3. Proces hemostazy płytkowej (w modyfikacji własnej) [33].

### 1.4. Hemostaza wtórna

Pierwotny czop płytkowy powstały w wyniku hemostazy pierwotnej jest nietrwały, dlatego do utworzenia stabilnego skrzepu niezbędne jest uruchomienie szlaków hemostazy wtórnej [34]. Hemostaza wtórna jest procesem proenzymatycznym, w wyniku którego następuje konwersja rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną i trwałą sieć fibryny, która wzmacnia agregację płytek krwi. W proces hemostazy wtórnej zaangażowane są osoczowe czynniki krzepnięcia [35].

### 1.4.1. Czynniki krzepnięcia

Czynniki krzepnięcia to ściśle złożony układ białek odrywający kluczową rolę w tworzeniu stabilnego skrzepu hemostatycznego. Większość czynników krzepnięcia to prekursorzy enzymów proteolitycznych, zwanych zymogenami, które krążą w formie nieaktywnej. Prawie wszystkie czynniki krzepnięcia syntetyzowane są w hepatocytach wątroby. Wyjątek stanowi czynnik VIII, który jest wytwarzany głównie przez sinusoidalne komórki śródbłonna wątroby, a także tkankę limfatyczną. Właściwości biochemiczne czynników krzepnięcia warunkują ich klasyfikację na trzy główne grupy:

- **czynniki zależne od aktywacji trombiną:** I, V, VIII oraz XIII - wchodzi w interakcję z trombiną; nie występują w surowicy, ponieważ są zużywane w procesie krzepnięcia;
- **czynniki zespołu protrombiny:** II, VII, IX oraz X - są syntetyzowane przy udziale witaminy K;
- **czynniki kontaktu:** XI, XII, prekalkreina oraz wielkocząsteczkowy kininogen - biorą udział w początkowej aktywacji szlaku wewnątrzpo pochodnego, a do aktywacji wymagają kontaktu z ujemnie naładowaną powierzchnią.

Fundamentalnym mechanizmem aktywacji wszystkich czynników krzepnięcia jest ich specyficzna ograniczona proteoliza. W przypadku czynników II, VII, IX i X, witamina K stanowi niezbędny kofaktor w procesie ich biosyntezy oraz aktywacji. W wyniku posttranslacyjnej karboksylacji zależnej od witaminy K, obecne w cząsteczkach białek prekursorowych reszty glutaminianowe zostają przekształcone w reszty gamma-karboksyglutaminianowe. Na skutek tej reakcji czynniki krzepnięcia zależne od witaminy K nabywają zdolności do wiązania jonów wapnia, co w konsekwencji umożliwia im wiązanie się z wysokim powinowactwem z ujemnie naładowanymi obszarami błony fosfolipidowej [36–41].



#### 1.4.2. Kaskadowy model krzepnięcia

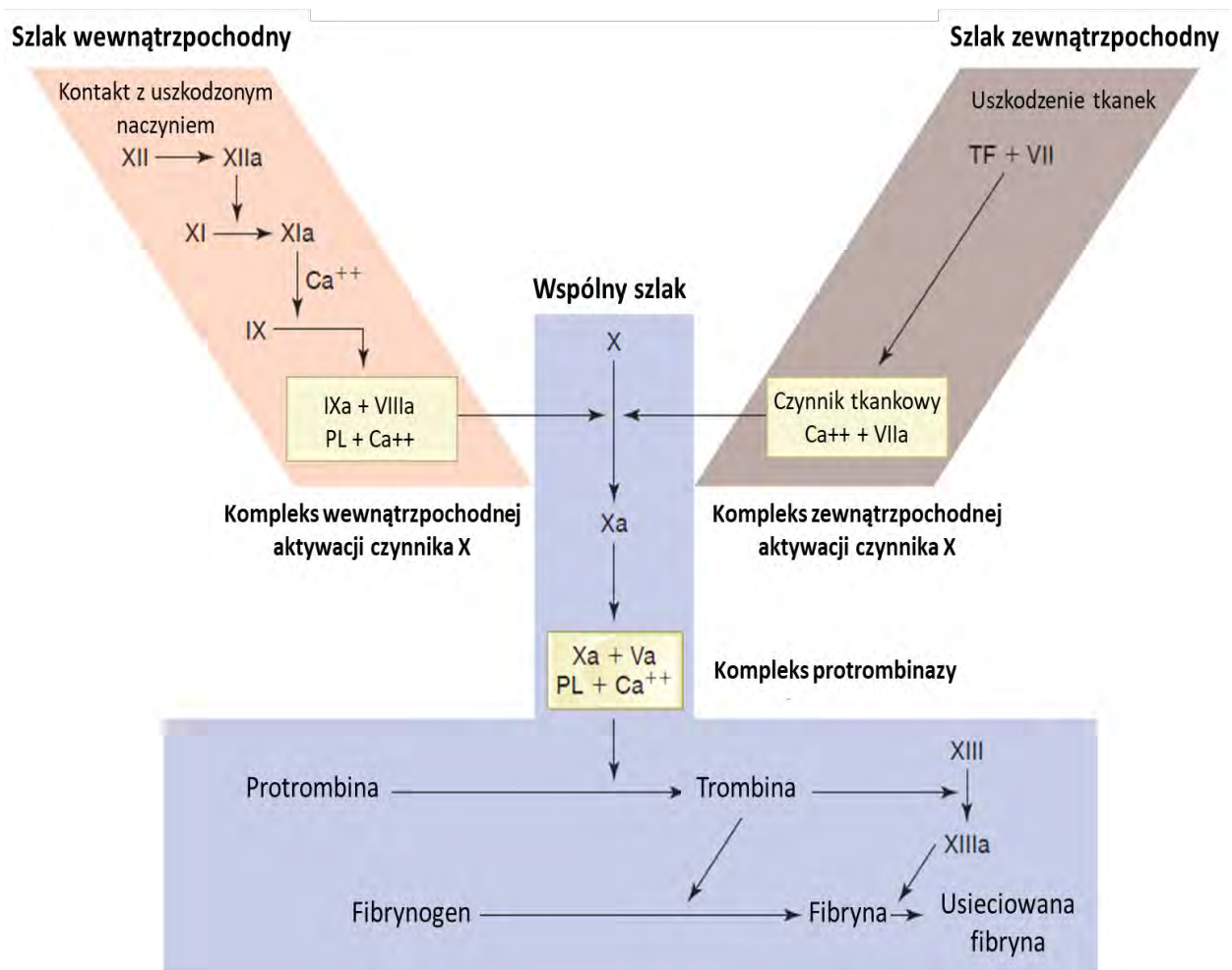
Oryginalny kaskadowy model krzepnięcia po raz pierwszy został opisany przez Davie'a, Ratnoffa i Macfarlane'a w latach 60. XX wieku. Zaprezentowany przez nich mechanizm aktywacji układu krzepnięcia oparty jest na dwóch wzajemnie powiązanych i zazębiających się szlakach: szlaku zewnątrzpochodnym oraz wewnątrzpochodnym. Zgodnie z modelem kaskadowym, po uruchomieniu procesu koagulacji przez którykolwiek z tych niezależnych szlaków, poszczególne czynniki krzepnięcia są kolejno aktywowane w kaskadzie amplifikacji, zwanej „wodospadem”. W myśl tej koncepcji, krążące nieaktywne proenzymy lub zymogeny czynników krzepnięcia zostają specyficznym sposobem aktywowane drogą ograniczonej proteolizy poprzez aktywowany wcześniej czynnik krzepnięcia. Aktywacja ta przebiegała następnie stopniowo w dół kaskady, ostatecznie prowadząc do wytworzenia trombiny i utworzenia usieciowanej fibryny [36, 42].

Szlak zewnątrzpochodny zostaje zapoczątkowany w wyniku kontaktu osocza z komórkami podśródbłonkowymi. Po uszkodzeniu naczynia komórki okołonaczyniowe eksponują i uwalniają czynnik tkankowy (TF, ang. *tissue factor*), który wiąże się z nieaktywnym czynnikiem VII i przekształca go w aktywną formę czynnika VIIa. Kompleks TF-VIIa (znany również jako kompleks inicjujący) z kolei przekształca czynnik X w aktywowany czynnik X (Xa). Następnie czynnik Xa wiąże się z aktywowanym czynnikiem V (Va) obecnym w powierzchniowych fosfolipidach komórki, uruchamiając wspólny dla obu szlaków etap kaskady krzepnięcia [36, 43].

Szlak wewnątrzpochodny jest inicjowany niezależnie od szlaku zewnątrzpochodnego poprzez aktywację kontaktową, a konkretnie przez kontakt osocza z dowolną powierzchnią inną niż śródbłonek naczyniowy (np. z błoną podstawną śródbłonka naczyniowego lub z włóknami kolagenowymi tkanki łącznej) w obszarze, w którym nastąpiło uszkodzenie naczyń. Powierzchnie te stanowią rusztowanie do tworzenia kompleksu aktywacji kontaktowej, który wymaga udziału wielkocząsteczkowego kininogenu (HMWK, ang. *high-molecular weight kininogen*), prekalikreiny oraz czynnika XII. W swojej nieaktywnej formie czynnik XII posiada niezbędną aktywność katalityczną do przekształcenia prekalikreiny w kalikreinę. Kalikreina z kolei przekształca czynnik XII w aktywowany czynnik XII (XIIa). Następnie czynnik XIIa w przy udziale wapnia aktywuje czynnik XI i przekształca go do aktywnej formy XIa, który następnie aktywuje czynnik IX do IXa. W obecności jonów  $Ca^{2+}$  oraz fosfolipidów aktywowany czynnik IX

oraz jego kofaktor VIIIa tworzą kompleks tenazy, którego główną funkcją jest aktywacja czynnika X oraz inicjacja wspólnego szlaku kaskady krzepnięcia [43, 44].

Szlak wewnątrzpochodny oraz zewnątrzpochodny zbiegają się w procesie aktywacji czynnika X. Zainicjowany wspólny szlak przebiega poprzez interakcję pomiędzy czynnikiem Xa i kofaktorem Va, które wspólnie z protrombiną w obecności jonów wapnia oraz fosfolipidów płytkowych i tkankowych tworzą kompleks protrombinazy stymulujący konwersję protrombiny do trombiny. W wyniku tej reakcji następuje przekształcenie krążącego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę oraz aktywacja czynnika XIII (XIIIa), który kowalencyjnie sieciuje polimery fibryny wbudowane w czop płytkowy. W ten sposób zostaje uformowana sieć fibrynowa, która stabilizuje pierwotny skrzep płytkowy i tworzy ostateczny wtórny czop hemostatyczny [36, 44].



**Rycina 4.** Tradycyjny model kaskady krzepnięcia (w modyfikacji własnej). PL — fosfolipidy [39].

Klasyczna teoria krzepnięcia krwi jest szczególnie przydatna do zrozumienia testów krzepnięcia *in vitro*, jednakże nie uwzględnia znaczącej roli powierzchni komórkowych w procesie krzepnięcia *in vivo*. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że szlak wewnątrzpochodny może zostać aktywowany poprzez kontakt ze szkłem, kaolinem lub generalnie z ujemnie naładowaną powierzchnią, co obecnie ma praktyczne zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej oraz w interpretacji badań koagulologicznych [36, 44].

### 1.4.3. Nowa koncepcja teorii krzepnięcia

Kaskadowy model krzepnięcia pozostawał aktualny przez długi czas. Chociaż klasyczna koncepcja krzepnięcia jest prawidłowym modelem i stanowi znaczący postęp w rozumieniu procesu koagulacji, to najnowsze obserwacje kliniczne i eksperymentalne pokazują, że hipoteza „kaskady” nie odzwierciedla w pełni hemostazy w warunkach *in vivo*. Krytyczne błędy we wcześniejszych modelach krzepnięcia doprowadziły do podjęcia dalszych badań i opracowania przez Monroe’a i Hoffman w 2001 roku komórkowo-zależnego modelu hemostazy. Nowy model sugeruje interakcję czynników krzepnięcia z określonymi powierzchniami komórek i skupia się na oddziaływaniach komórkowo-osoczowych dotychczas niewyjaśnianych przez tradycyjną kaskadę krzepnięcia. Zgodnie z tym założeniem, nie tylko krążące białka inicjują aktywację krzepnięcia, ale także różne komórki, które są źródłem fosfatydyloseryny działającej jako katalizator reakcji proteolizy czynników krzepnięcia. Obecnie model ten jest powszechnie akceptowany i uważany za najlepiej opisujący mechanizm hemostazy wtórnej. Aktualne rozumienie procesu hemostatycznego uwzględnia wzajemne powiązania procesów fizycznych, komórkowych oraz biochemicznych oraz podważa istnienie dwóch niezależnych szlaków (wewnątrz- i zewnątrzpochodnego) tak jak wcześniej sądzono [44–46].

Komórkowy model krzepnięcia krwi wyróżnia cztery odrębne, nakładające się fazy procesu hemostatycznego: fazę inicjacji, wzmocnienia propagacji oraz terminacji [45].

Zgodnie z komórkowym modelem krzepnięcia, podstawowym inicjatorem krzepnięcia jest czynnik tkankowy. Faza inicjacji następuje po uszkodzeniu naczyń i rozpoczyna się w chwili uwolnienia do krążenia czynnika tkankowego przez komórki posiadające zdolność do ekspresji TF, w tym komórki mięśni gładkich, komórki przydanki oraz fibroblasty. Odsłonięty TF wiąże się z krążącym czynnikiem VIIa, tworząc kompleks TF-VIIa, który przekształca czynniki IX i X

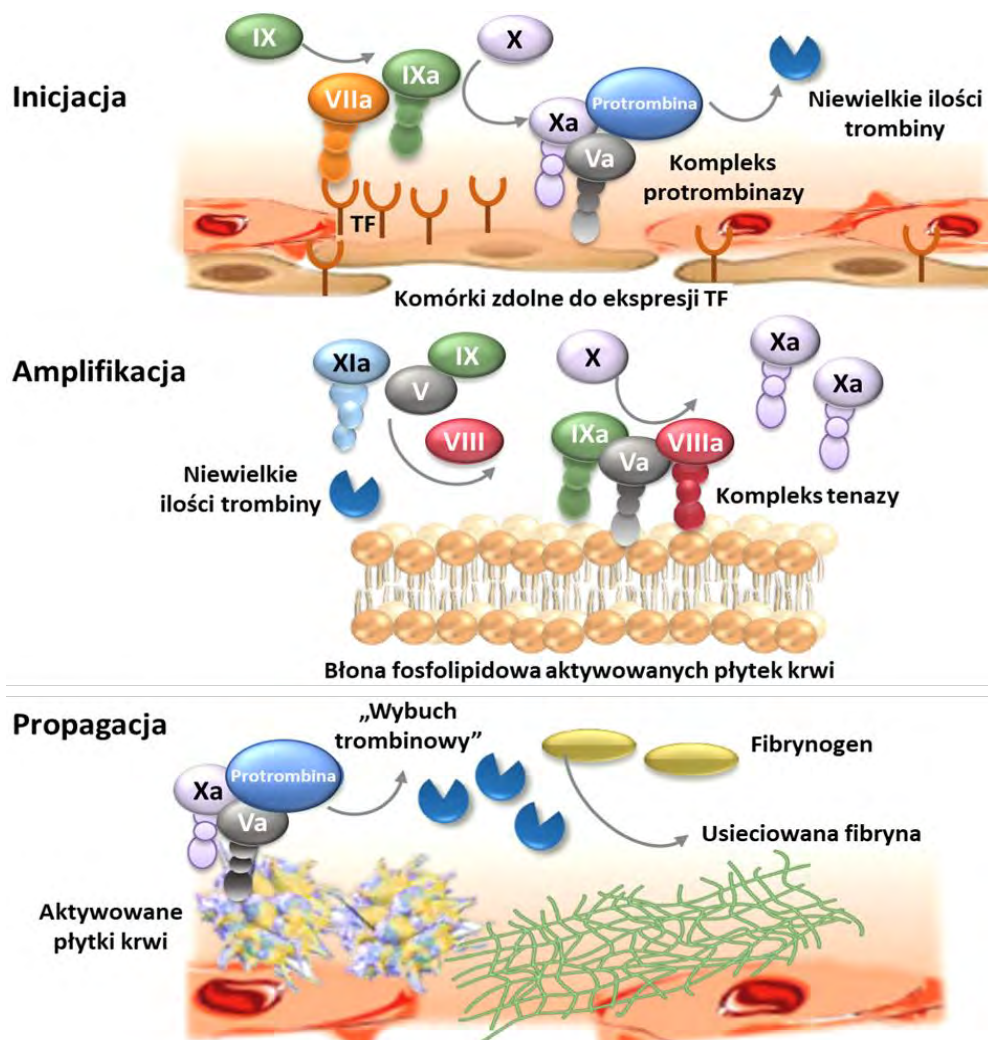
w ich aktywne formy IXa oraz Xa. Czynniki Xa następnie wiąże się ze swoim kofaktorem, czynnikiem Va, który został uwolniony z ziarnistości alfa płytek krwi podczas płytkowej aktywacji w wyniku adhezji do uszkodzonego łożyska naczyniowego. Powstały kompleks Xa-Va wiąże się z protrombiną, generując niewielką ilość trombiny, niewystarczającą do wytworzenia fibryny. Powstanie trombiny podczas fazy inicjacji jest ściśle kontrolowane przez czynniki hamujące. Na tym etapie kompleks TF-VIIa-Xa jest szybko hamowany przez inhibitor szlaku czynnika tkankowego (TFPI, ang. *tissue factor pathway inhibitor*). Dodatkowo, czynnik Xa oraz trombina zostają neutralizowane przez inhibitor proteazy serynowej - antytrombinę (AT, ang. *antithrombin*). W fazie inicjacji powstają jedynie śladowe ilości trombiny, a dalsze wytwarzanie trombiny zależy od powodzenia fazy propagacji [44, 47–49].

W drugiej fazie procesu krzepnięcia, amplifikacji, zostaje ujawniony trombinocentryczny charakter modelu komórkowego, który uwzględnia kluczową rolę trombiny we wzmacnianiu aktywacji odpowiedzi hemostatycznej. Niewielka ilość wytworzonej trombiny w fazie inicjacji wspomaga aktywację płytek krwi zapoczątkowaną na etapie hemostazy pierwotnej poprzez wiązanie się z receptorami aktywowanymi przez proteazy (PAR, ang. *protease-activated receptors*) obecnymi na powierzchni komórek płytek krwi. W wyniku aktywacji tych receptorów dochodzi do zmiany morfologicznej płytek krwi oraz uwolnienia substancji prokoagulacyjnych z ich ziarnistości. Powstała trombina jest odpowiedzialna również za katalizację proteolityczną czynników XI oraz V do ich aktywnych form XIa oraz Va na powierzchni płytek krwi. Kolejną istotną funkcją trombiny jest jej udział w aktywacji czynnika VIII. Za pośrednictwem niewielkiej ilości trombiny dochodzi do rozszczepienia krążącego w osoczu kompleksu VIII-vWF poprzez odłączenie czynnika von Willebranda i uwolnienie aktywnego czynnika VIIIa. Po dysocjacji, uaktywniony czynnik vWF umożliwia adhezję oraz agregację płytek do warstwy podśródbłonkowej [45, 48–50].

W fazie propagacji następuje migracja dużej liczby płytek krwi do miejsca uszkodzenia oraz nagromadzenie na powierzchni płytek krwi kluczowych czynników uczestniczących w generacji znacznie większych ilości trombiny. Aktywowany podczas fazy inicjacji czynnik IX wiąże się z czynnikiem VIIIa, tworząc kompleks tenazy. Z kolei zainicjowany kompleks tenazy prowadzi do powstania dużej ilości czynnika Xa. Aktywny czynnik Xa szybko łączy się z czynnikiem Va, który został związany z powierzchnią płytek krwi podczas fazy amplifikacji, co w następstwie powoduje utworzenie kompleksu protrombinazy przekształcającego duże ilości protrombiny w trombinę. Wygenerowany przez te mechanizmy tak zwany „wybuch

trombinowy”, polegający na wytworzeniu ogromnych ilości trombiny, prowadzi do rozległej stymulacji hemostazy. Powstałe duże ilości trombiny są wystarczające do przekształcenia fibrynogenu w fibrynę oraz aktywacji czynnika XIII do XIIIa, który polimeryzuje włókna fibryny i stabilizuje skrzep fibrynowy. W przeciwieństwie do poprzednich modeli, najnowsze odkrycia sugerują, że czynnik krzepnięcia XII nie jest potrzebny do tworzenia fibryny i nie ma istotnego znaczenia dla prawidłowej hemostazy. Udowodniono, że trombina powstała podczas fazy inicjacji jest w stanie aktywować czynnik XI bez współdziałania czynnika XII, niemniej jednak czynnik XII jest niezbędny w dalszym w procesie fibrynolizy [45, 46, 49].

Fazę terminacji definiuje się jako ograniczenie zużywania protrombiny oraz trwającą inaktywację trombiny i innych enzymów krzepnięcia. W przebiegu fazy terminacji proces krzepnięcia zostaje ograniczony do miejsca uszkodzenia, zapobiegając w ten sposób tworzenie się zakrzepów. W procesie kontrolowania aktywacji krzepnięcia zaangażowane są cztery naturalne antykoagulanty; TFPI, białko C, białko S oraz antytrombina [46, 50].



Rycina 5. Komórkowy model aktywacji krzepnięcia (w modyfikacji własnej) [42].

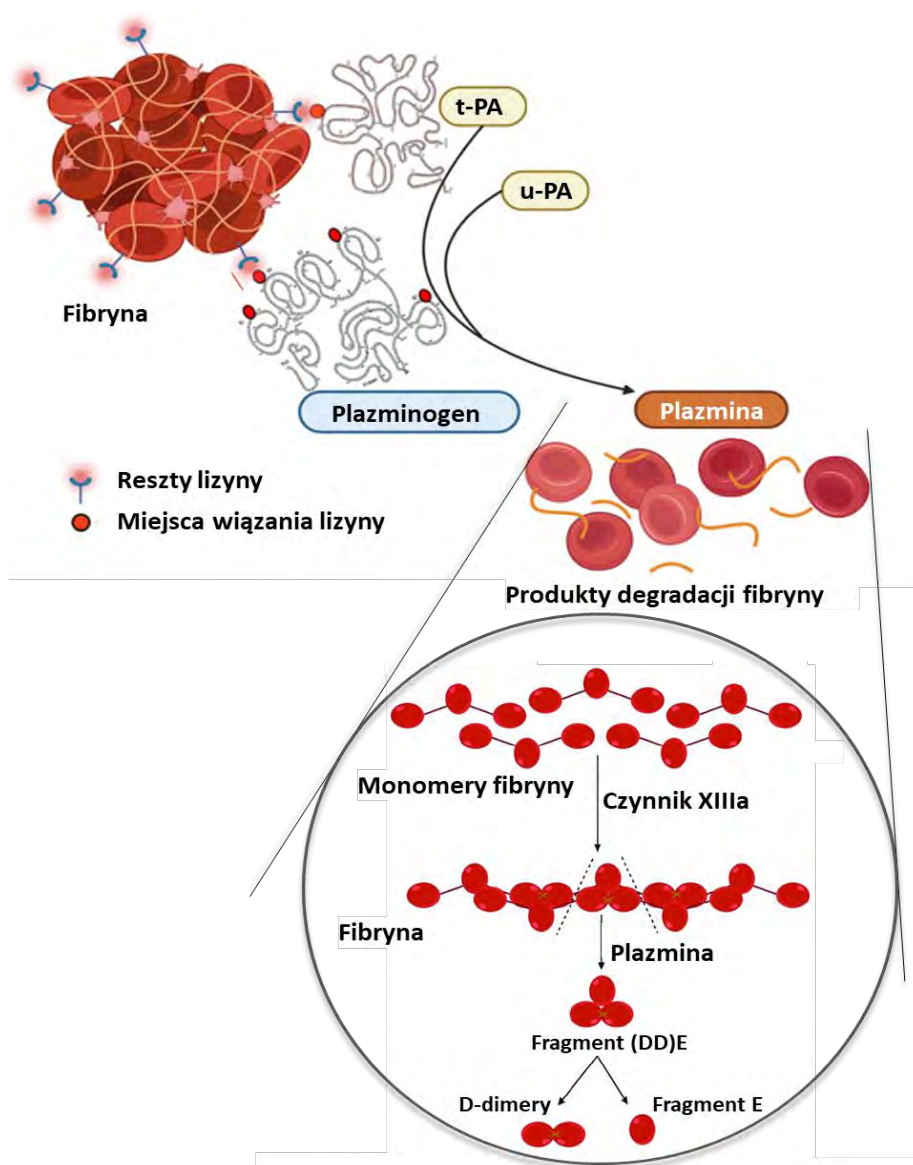
## 1.5. Fibrynoliza

Fibrynoliza jest wysoce regulowanym procesem enzymatycznym, który zapobiega niepotrzebnemu gromadzeniu się fibryny wewnątrznaczyniowej oraz umożliwia rozpuszczenie włókniaka [51, 52].

W warunkach fizjologicznych fibrynoliza jest aktywowana w odpowiedzi na aktywację układu krzepnięcia. Tworzenie fibryny zasadniczo inicjuje fibrynolizę poprzez interakcję poszczególnych komponentów fibrynolitycznych. Elementami układu fibrynolizy są: plazminogen, aktywatory plazminogenu, inhibitory aktywatorów plazminogenu oraz inhibitory plazminy. Głównym mediatorem procesu fibrynolizy jest plazmina, która odpowiada za rozkład fibryny do rozpuszczalnych produktów degradacji fibryny (FDPs, ang. *fibrin degradation products*). W środowisku wewnątrznaczyniowym plazmina występuje w postaci plazminogenu, nieaktywnego zymogenu pierwotnie syntetyzowanego w wątrobie. Istotnym etapem aktywacji układu fibrynolitycznego jest konwersja plazminogenu do aktywnej postaci plazminy poprzez proteolityczne rozszczepienie pojedynczego wiązania peptydowego. W aktywacji plazminogenu do plazminy pośredniczą dwa główne aktywatory typu proteaz serynowych: tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA, ang. *tissue plasminogen activator*) oraz aktywator plazminogenu typu urokinazy (u-PA, ang. *urokinase-type plasminogen activator*). W pewnym przybliżeniu można przyjąć, że aktywacja plazminogenu przez t-PA jest odpowiedzialna za trombolizę w łożysku naczyniowym. W przeciwieństwie do tego, wytwarzanie plazminy wyzwalane przez u-PA zachodzi głównie w tkankach i jest związane głównie z przebudową tkanek [39, 51–55].

Kluczowymi miejscami aktywacji fibrynolizy są powierzchnie fibryny, które modulują wiązanie plazminy. W ujęciu molekularnym, tromboliza jest warunkowana przez obecność C-końcowych reszt lizyny, które tworzą się na powierzchni fibryny podczas jej formowania. Reszty lizyny są rozpoznawane przez miejsca wiązania lizyny (LBSs, ang. *lysine-binding sites*) zlokalizowane w obrębie domen plazminogenu oraz jego aktywatora t-PA. Taka struktura aminokwasowa fibryny nie tylko umożliwia wiązanie składników fibrynolizy, ale także znacząco zwiększa aktywność proteolityczną t-PA, pod wpływem którego nieaktywny plazminogen zostaje przekształcony w plazminę. Utworzenie trójskładnikowego kompleksu składającego się z aktywatora t-PA, plazminogenu oraz substratu (fibryny) powoduje ukierunkowaną, specyficzną degradację fibryny [39, 51, 56].

Aktywowana plazmina odpowiada za asymetryczną, postępującą degradację fibrynogenu oraz fibryny, tworząc odrębne fragmenty białkowe. Końcowymi produktami degradacji fibrynogenu przez plazminę jest fragment E odpowiadający centralnej domenie E oraz dwa fragmenty D odpowiadające domenom D. W przypadku degradacji fibryny stabilizowanej czynnikiem XIII powstaje fragment E, ale zamiast fragmentów D uwalniane są dimery D-D, określane jako D-dimery. W proteolitycznej degradacji fibryny mogą również pojawiać się różne produkty pośrednie (polipeptydy lub oligomery), znane jako produkty degradacji sieciującej fibryny (XL-FDPs, ang. *cross linking fibrin degradation products*). Za eliminację z krążenia fragmentów powstałych w wyniku trawienia fibrynogenu oraz fibryny odpowiedzialna jest wątroba [39, 57].

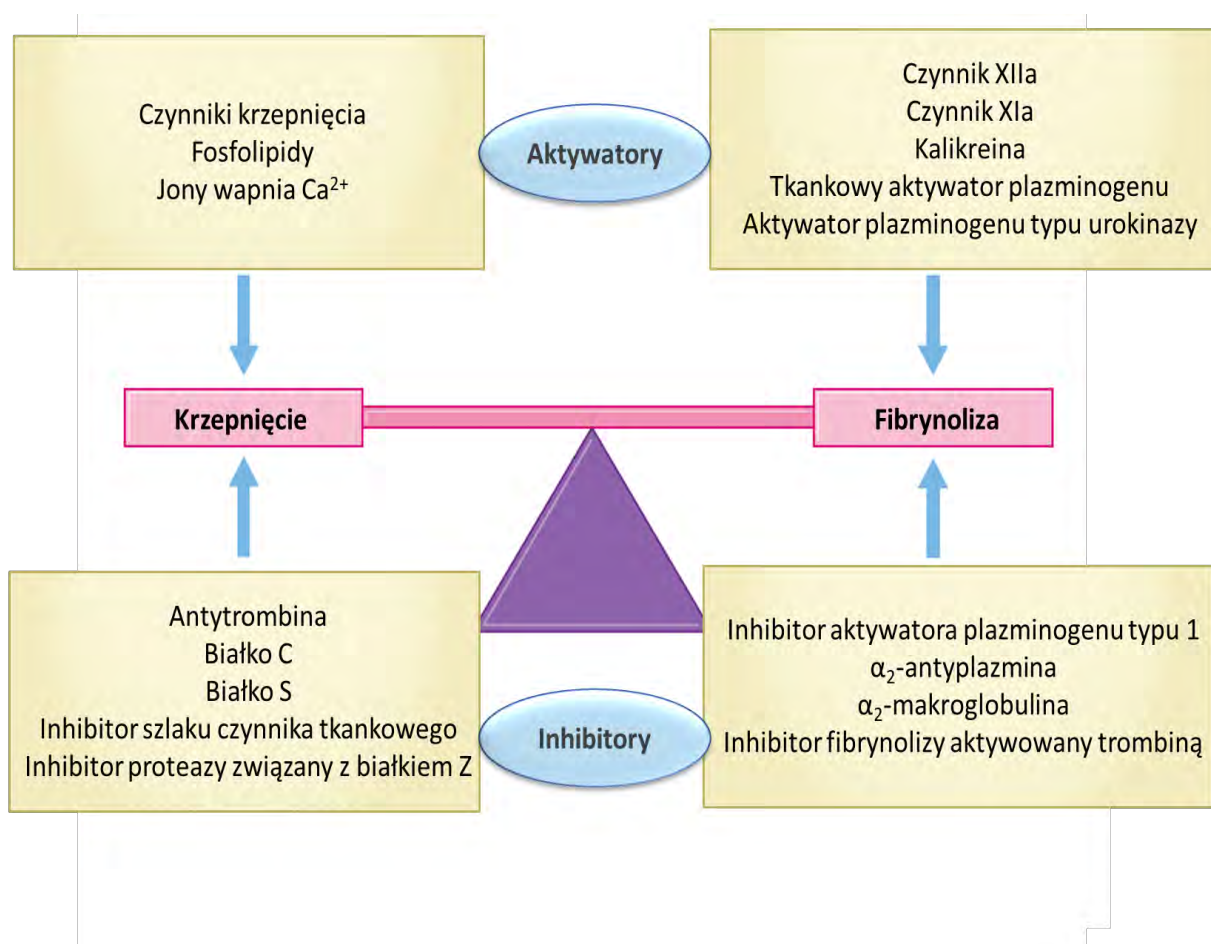


**Rycina 6.** Fizjologia procesu fibrynolizy (w modyfikacji własnej) [58, 59].



## 1.6. Regulacja procesu hemostazy

Układ krzepnięcia oraz fibrynolizy są ze sobą wzajemnie powiązane i ściśle regulowane poprzez mechanizmy zapewniające zrównoważoną hemostazę. Warto podkreślić, że krzepnięcie krwi i fibrynoliza pełnią funkcję uzupełniających, ale jednocześnie konkurujących mechanizmów w procesie zachowania prawidłowego krążenia. Za prawidłową regulację procesu hemostazy odpowiadają dwa główne układy: układ antykoagulacyjny ograniczający tworzenie fibryny oraz układ antyfibrynolityczny zapobiegający systemowej proteolizie. W warunkach fizjologicznych za utrzymanie równowagi układu hemostatycznego odpowiedzialne są przede wszystkim inhibitory krzepnięcia i fibrynolizy [39, 51, 60, 61].



**Rycina 7.** Elementy zapewniające równowagę procesu hemostazy (w modyfikacji własnej) [39].



### 1.6.1. Regulacja procesu krzepnięcia

Proces krzepnięcia posiada swoje elementy o charakterze antykoagulantów, które zostają uruchamiane na każdym etapie procesu krzepnięcia, zapobiegając tym samym występowaniu nadmiernej tendencji do tworzenia zakrzepów. Istotnym elementem zbilansowanej hemostazy odgrywają naturalnie występujące inhibitory krzepnięcia, do których należą: antytrombina, inhibitor szlaku czynnika tkankowego, układ białek C i białek S oraz inhibitor proteazy zależnej od białka Z/białko Z [35, 36, 53, 62].

Głównym i najważniejszym inhibitorem krzepnięcia jest antytrombina, będąca inhibitorem proteazy serynowej. Antytrombina utrudnia wytwarzanie fibryny poprzez wiązanie i inaktywację trombiny, czynnika IXa, Xa, XIa oraz XIIa. Aktywność enzymatyczna antytrombiny wobec wszystkich swoich substratów wzrasta co najmniej 1000-krotnie w obecności heparyny [36, 53, 61].

Inhibitor szlaku czynnika tkankowego (TFPI) jest kluczowym regulatorem fazy inicjacji wytwarzania trombiny. TFPI jest syntetyzowany w komórkach śródbłonka naczyniowego i uwalniany ze znajdujących się na powierzchni śródbłonka naczyniowego płytek krwi aktywowanych trombiną. Wraz z inicjacją procesu krzepnięcia przez TF-VIIa następuje natychmiastowa inaktywacja tego kompleksu przez TFPI. Sam TFPI ma niewielki wpływ na czynnik VIIa. W pierwszej kolejności TFPI wiąże się z czynnikiem Xa, tworząc kompleks TFPI-Xa, w którym FXa jest odwracalnie hamowany. Kompleks TFPI-Xa następnie wiąże się z docelowym kompleksem TF-VIIa, tworząc czwartorzędowy kompleks, w którym hamowany są zarówno czynnik VIIa, jak i Xa [53, 61].

Faza amplifikacji/propagacji krzepnięcia krwi jest hamowana przez szlak białka C, który składa się głównie z czterech kluczowych elementów: białka C, trombomoduliny, receptora śródbłonkowego białka C oraz białka S. Trombomodulina jest receptorem transbłonowym występującym na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego, która poprzez wiązanie trombiny powoduje aktywację białka C do formy aktywowanego białka C (APC, ang. *activated protein C*). Aktywowane białko C wraz z białkiem S jako kofaktorem inaktywuje czynniki Va oraz VIIIa, regulując w ten sposób fazę amplifikacji i propagacji krzepnięcia. Białko C jest proteazą serynową o silnych właściwościach przeciwwzakrzepowych, profibrynolitycznych i przeciwzapalnych. Z kolei białko S dodatkowo uczestniczy w bezpośrednim, odwracalnym hamowaniu kompleksu protrombinazy. Istotnym elementem szlaku białka C jest również

receptor śródbłonkowy białka C, który jest receptorem przezbłonowym, wspomagającym i dodatkowo stymulującym aktywację białka C [36, 53, 63].

Inhibitor proteazy związany z białkiem Z (ZPI, ang. *protein Z-dependent protease inhibitor*) jest niedawno poznany składnikiem układu antykoagulacyjnego. Syntetyzowany jest w wątrobie. Rolą tego inhibitora jest hamowanie czynnika Xa w reakcji wymagającej białka Z oraz wapnia [36].

### 1.6.2. Regulacja procesu fibrylizacji

Podobnie jak proces krzepnięcia, aktywność układu fibrynolitycznego jest ściśle regulowana przez szereg kofaktorów, inhibitorów oraz receptorów. Inhibitory fibrylizacji stanowią kluczowy element zapobiegający nadmiernej i nieuregulowanej aktywności plazminy. Fibrylizacja kontrolowana jest poprzez następujące elementy: (1) inhibitory aktywatora plazminogenu, które zapobiegają aktywacji i konwersji plazminogenu do plazminy; (2) bezpośrednie inhibitory plazminy oraz (3) modulatory fibryny, metaloproteiny. W warunkach fizjologicznych proces fibrylizacji jest kontrolowany przez cztery główne inhibitory: inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1, ang. *plasma activator inhibitor type 1*),  $\alpha_2$ -antyplazminę,  $\alpha_2$ -makroglobulinę oraz inhibitor fibrylizacji aktywowany trombiną (TAFI, ang. *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) [51, 61].

Inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 jest silnym inhibitorem fibrylizacji. Poznano trzy typy PAI, ale za główny inhibitor fizjologiczny uważa się PAI typu 1. PAI-1 jest glikoproteiną należącą do rodziny serpin i jest syntetyzowany przez różne komórki, w tym megakariocyty, komórki śródbłonka naczyniowego, hepatocyty i adipocyty. Inhibitor ten w wyniku nieodwracalnego wiązania i inaktywacji aktywatorów plazminogenu t-PA oraz u-PA zapobiega aktywacji plazminogenu, co w konsekwencji hamuje główną reakcję układu fibrynolitycznego - konwersję plazminogenu do plazminy [61, 64].

$\alpha_2$ -antyplazmina jest głównym fizjologicznym inhibitorem plazminy występującym w osoczu. Jest to krążąca glikoproteina należąca do grupy serpin, syntetyzowana głównie w wątrobie. Funkcją antyfibrynolityczną  $\alpha_2$ -antyplazminy jest bezpośrednie wiązanie i hamowanie plazminy poprzez tworzenie kompleksu plazmina-antyplazmina (PAP, ang. *plasmin-antiplasmin complex*) w stosunku stechiometrycznym 1:1. Dodatkowo,

$\alpha_2$ -antyplazmina może być rekrutowana i kowalencyjnie inkorporowana w struktury włókna podczas sieciowania fibryny, czyniąc skrzep bardziej odpornym na fibrylizę [51, 61, 65–67].

$\alpha_2$ -makroglobulina uważana jest za wtórny i rezerwowy inhibitor plazminy, działając jako „druga linia obrony” w przypadkach intensywnej aktywacji i generacji plazminy. Oprócz swojej zdolności do bezpośredniego hamowania plazminy,  $\alpha_2$ -makroglobulina uczestniczy również w inaktywacji t-PA, u-PA, APC oraz kalikreiny [39, 61, 68].

Innym ważnym regulatorem fibrylizy jest inhibitor fibrylizy aktywowany trombiną. TAFI jest karboksypeptydazą syntetyzowaną w wątrobie i aktywowaną przez trombinę w obecności trombomoduliny. Aktywowana proteaza TAFI odszczepia C-końcowe reszty lizyny z powierzchni fibryny, zmniejszając w ten sposób liczbę dostępnych miejsc wiązania plazminogenu. W ten sposób TAFI skutecznie blokuje wiązanie plazminogenu z fibryną, hamuje aktywację plazminogenu przez t-PA i w konsekwencji ogranicza degradację fibryny [51, 67].

## 2. Rak piersi

### 2.1 Definicja

Rak piersi jest heterogennym nowotworem złośliwym charakteryzującym się niekontrolowanym i niepohamowanym rozrostem nieprawidłowych komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego. Rak piersi jest niezwykle istotnym problemem zdrowotno-społecznym i stanowi ogromne wyzwanie dla zdrowia publicznego w skali globalnej. Jest to najczęściej występujący nowotwór oraz główna przyczyna zgonu u kobiet na świecie. Wyróżniającą cechą tego nowotworu jest odmienny przebieg kliniczny oraz różna odpowiedź na leczenie, pomimo wspólnych cech histopatologicznych w momencie rozpoznania. Badania podłoża molekularnego sugerują, że rak piersi to zbiór chorób o zmiennym podłożu molekularnym, które moduluje odpowiedź terapeutyczną, przeżycie wolne od choroby oraz przeżycie całkowite [69–73].

### 2.2. Epidemiologia raka piersi w Polsce i na świecie

W świetle aktualnych danych epidemiologicznych rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem i wiodącą przyczyną zgonów z powodu choroby nowotworowej u kobiet na całym świecie. Według danych opublikowanych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) w ramach GLOBOCAN liczba nowych pacjentek z rozpoznaniem rakiem piersi w 2020 roku wynosiła 2 261 419 przypadków. W ujęciu globalnym odsetek zachorowań na raka piersi w porównaniu z innymi często występującymi nowotworami wynosi 24,5%, co sugeruje, że co czwarty złośliwy nowotwór u kobiet jest diagnozowany jako rak piersi. Surowy i standaryzowany według wieku współczynnik zachorowalności na raka piersi wynosiły odpowiednio 58,5 i 47,8/100 000 osób. Spośród wszystkich krajów największą liczbę przypadków raka piersi odnotowano w Chinach, stanowiących około 18,4% wszystkich przypadków raka piersi na świecie, a następnie w USA, gdzie odnotowano 11,8% wszystkich zdiagnozowanych incydentów raka piersi. Standaryzowane według wieku współczynniki zachorowalności w poszczególnych krajach różniły się ponad trzykrotnie, od 113,2/100 000 osób w Belgii do 35,8/100 000 osób w Iranie. W porównaniu ze średnim współczynnikiem zachorowalności dla populacji ogólnoswiatowej, w krajach wysoko rozwiniętych, takich jak Belgia, Dania, Australia, USA, Wielka Brytania

i Włochy współczynniki zachorowalności były znacznie wyższe, z kolei kraje rozwijające się, takich jak Iran, Chiny, Meksyk, Kamerun, i Kostaryka charakteryzowały się znacznie niższymi wskaźnikami zachorowalności. Według stanu na koniec 2020 roku, w okresie ostatnich 5 lat łączna ilość kobiet zmagająca się rakiem piersi wynosiła 7,8 milionów [74, 75].

Od kilku lat śmiertelność z powodu raka piersi stanowi największy odsetek zgonów nowotworowych wśród kobiet na całym świecie. Zarejestrowana liczba zgonów spowodowanych nowotworem piersi w 2020 roku wyniosła 684 996, co stanowi 15,5% wszystkich zgonów nowotworowych u kobiet. Surowe i standaryzowane według wieku współczynniki umieralności z powodu raka piersi wynosiły odpowiednio 17,7 i 13,6/100 000 osób standardowej populacji świata. Podobnie jak w przypadku zachorowalności, najwięcej zgonów z powodu raka piersi zarejestrowano w Chinach oraz USA, gdzie odnotowano odpowiednio 17,1% oraz 6,2% wszystkich zgonów z powodu raka piersi. W przeciwieństwie do wskaźników zachorowalności, wyższe wskaźniki umieralności występowały w większości krajów nierozwiniętych lub rozwijających się [74, 75].

Podobnie jak w przypadku populacji ogółnoświatowej, rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym rozpoznawanym u kobiet w Polsce. Według najnowszych danych pochodzących z Krajowego Rejestru Nowotworów, w 2020 roku odnotowano 17 511 nowo zdiagnozowanych przypadków raka piersi. W porównaniu z innymi powszechnymi nowotworami, rak piersi jest diagnozowany u 23,8% kobiet z rozpoznaną chorobą nowotworową. Zgodnie z surowym współczynnikiem zachorowalności, aktualnie na każde 100 000 osób polskiej populacji przypada 88,4 zachorowań na raka piersi. W Polsce rak piersi stanowi drugą, zaraz po raku płuc, najczęstszą nowotworową przyczynę śmierci wśród kobiet. W 2020 roku z powodu raka piersi zmarło łącznie 6 956 kobiet, a wskaźniki śmiertelności z powodu tego nowotworu wynosił średnio 35,1/100 000 osób populacji polskiej [76].

W ciągu ostatnich kilku dekad obserwuje się rosnący trend liczby zachorowań oraz zgonów z powodu raka piersi. Dalekosiężne prognozy wskazują, że w 2070 roku globalna liczba nowo rozpoznanych przypadków raka osiągnie 4,4 miliona w skali roku [75].

### 2.3. Patogeneza raka piersi

Etiologia raka piersi nie jest w pełni poznana. Na rozwój raka piersi może wpływać wiele wzajemnie powiązanych czynników, takich jak predyspozycje genetyczne, uwarunkowania środowiskowe, a także status hormonalny [77].

W ujęciu histologicznym, nowotwór piersi wywodzi się z nieprawidłowych komórek zrazików lub przewodów piersi. W wieloetapowym procesie nowotworzenia prawidłowe komórki gruczołu piersiowego przechodzą transformację kolejno poprzez etapy hiperplazji, atypowego rozrostu, przedinwazyjnego raka *in situ* i ostatecznie przyjmują postać inwazyjną. Na poziomie molekularnym, rak piersi jest konsekwencją szeregu zdarzeń molekularnych oraz obecności wielokrotnie powtarzających się mutacji komórkowych powstałych w wyniku działania czynników genetycznych, środowiskowych oraz modyfikacji epigenetycznych wpływających na ekspresję genów. Działanie czynników rakotwórczych prowadzi do niestabilności genomu, o czym świadczą mutacje genów somatycznych, zmiany liczby kopii i rearanżacje strukturalne chromosomów. Niestabilność genomu jest spowodowana defektami w naprawie uszkodzeń DNA, transkrypcji, replikacji DNA oraz mitotycznej segregacji chromosomów. Nowotworowa transkrypcja genów prowadzi do zaburzeń szlaków biochemicznych regulujących podstawowe funkcje komórkowe, co manifestuje się wzrostem guza nowotworowego i powstawaniem przerzutów do narządów odległych. [71, 72, 78].

Proces karcenogenezy odpowiedzialny za rozwój raka piersi można podzielić na trzy kolejno postępujące po sobie etapy:

#### **Inicjacja**

W wyniku ekspozycji komórek gruczołu piersiowego na czynniki kancerogenne lub w wyniku powstania samoistnych modyfikacji genetycznych dochodzi do pojawienia się powtarzalnych, permanentnych mutacji genowych w sekwencji DNA. Prosta pojedyncza mutacja nie wystarczy do powstania nowotworu, dlatego zgodnie z hipotezą „wielokrotnych uderzeń” nowotwór jest wynikiem nagromadzonych w komórce licznych mutacji DNA. W prawidłowych warunkach komórki posiadają zdolność naprawy uszkodzonego DNA lub możliwość uruchomienia szlaku apoptozy. Natomiast jeżeli uszkodzenie to nie zostanie naprawione w fizjologicznych procesach komórkowych lub komórka nie wejdzie na szlak apoptozy, powstała zmiana w materiale genetycznym zostaje utrwalona. Mutacje odpowiedzialne za proces nowotworzenia zachodzą przede wszystkim w kluczowych genach

kodujących białka regulujące proliferację komórek i apoptozę. Zmiany te są zwykle trwałe i nieodwracalne. W pierwszej kolejności w wyniku zaburzeń w materiale genetycznym dochodzi do inaktywacji genów supresorowych nowotworu (np. *p53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *CDKN2A*, cyklina D i kaspaza 8) lub aktywacji protoonkogenów w onkogenach (*HER2*, *c-myc*). Mutacje te kumulują się w zainicjowanych komórkach z każdym nowym cyklem replikacji DNA i skutkują rozregulowaniem biochemicznych szlaków sygnałowych związanych z proliferacją, przeżyciem i różnicowaniem komórek. Klonalna akumulacja komórek prowadzi histologicznie do rozrostu przewodowego, początkowo bez atypii.

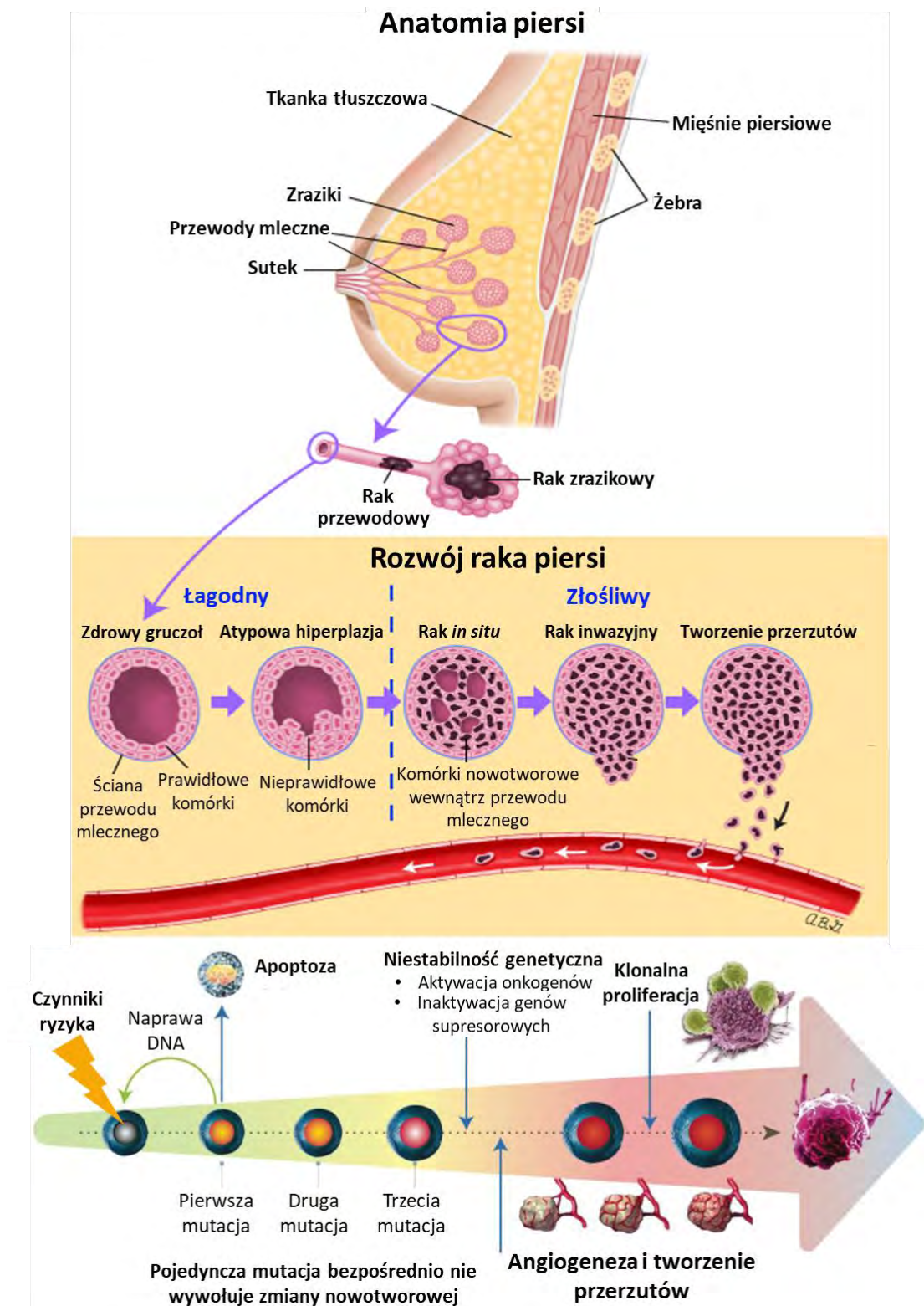
### **Promocja**

W tej fazie następuje selektywna klonalna ekspansja populacji zainicjowanych komórek. Komórki te są zdolne do autokrynej stymulacji proliferacji komórkowej w wyniku wydzielania czynników wzrostu takich jak EGF, IGF, VEGF, PDGF, transformujący czynnik wzrostu  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ , ang. *transforming growth factor alpha*) oraz czynnik indukowany hipoksją 1 (HIF-1 ang. *hypoxia-inducible factor 1*) i lub rekrutacji komórek zapalnych i zrębowych w celu produkcji tych czynników. W wyniku intensywnej klonalnej proliferacji zainicjowanych komórek, powstałe w fazie inicjacji uszkodzenia w materiale genetycznym zostają przekazane komórkom potomnym co prowadzi do utrwalenia mutacji. Dodatkowo, komórki rozwijają mechanizmy pozwalające uniknąć układu odpornościowego poprzez neutralizację limfocytów i makrofagów. Progresja stanowi fazę pomiędzy zmianą przednowotworową a rozwojem raka inwazyjnego. Histologicznie stwierdza się atypię jądrową niską aktywność mitotyczną, a także nacieki limfocytarne oraz markery proliferacji naczyń.

### **Progresja**

Proces transformacji nowotworowej na tym etapie osiąga punkt kulminacyjny. Progresja nowotworu obejmuje ekspresję fenotypu złośliwego i tendencję komórek złośliwych do nabywania z czasem co raz bardziej agresywnych cech. Charakterystyczną cechą fenotypu złośliwego jest skłonność do niestabilności genomu i niekontrolowanego wzrostu. Zmutowane komórki nowotworowe nabywają cech nieśmiertelności oraz zdolności do niekontrolowanej proliferacji, naciekania i przerzutowania. Wiąże się to z szybkim wzrostem średnicy guza, w którym komórki mogą ulegać dalszym mutacjom o potencjale inwazyjnym i przerzutowym. Charakter przerzutowy jest związany przede wszystkim ze zdolnością komórek nowotworowych do wydzielania proteaz, które umożliwiają inwazję poza bezpośrednią

lokalizację guza pierwotnego. Fenotypowo są to nowotwory opisywane jako *in situ* oraz nowotwory inwazyjne [79–84].



**Rycina 8.** Anatomia piersi oraz patofizjologia raka piersi na poziomie histologicznym i molekularnym (w modyfikacji własnej) [78, 85].



## 2.4. Czynniki ryzyka raka piersi

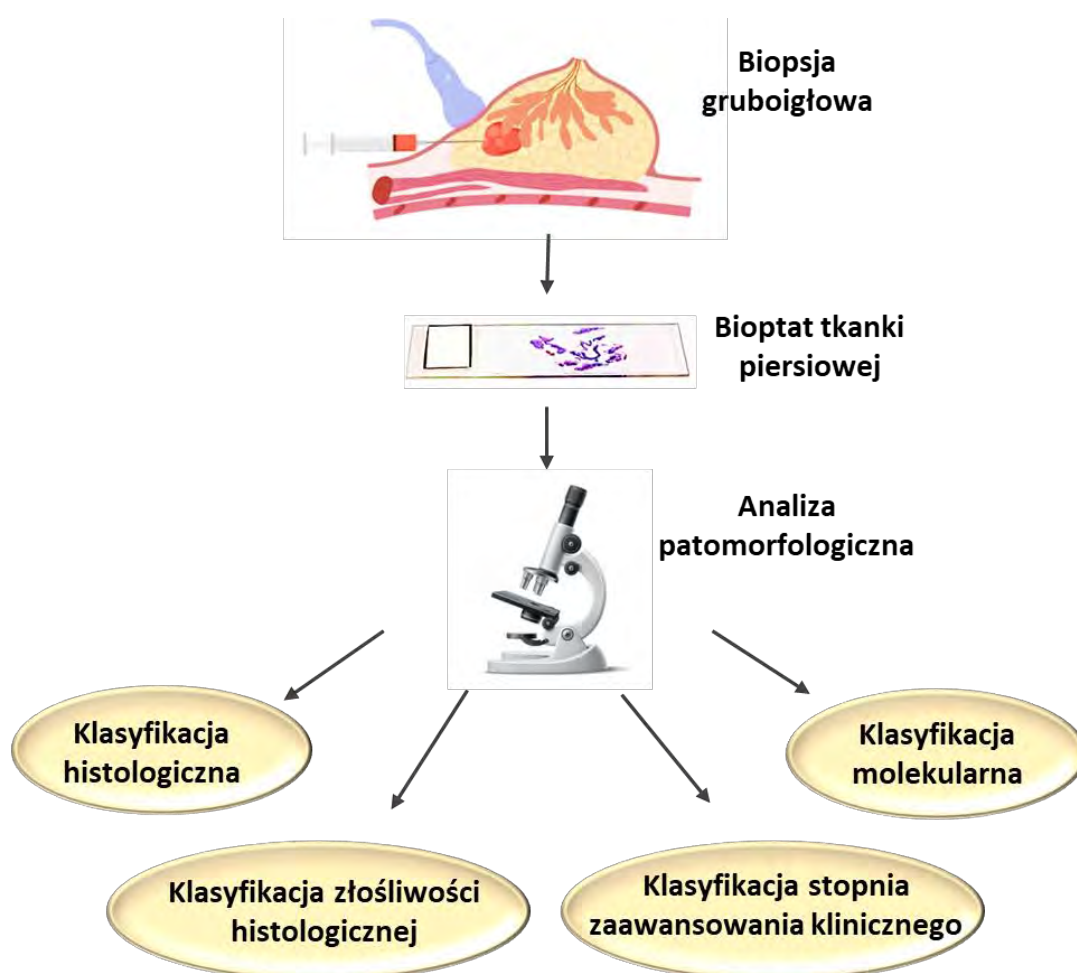
Patogeneza raka piersi jest złożona wieloczynnikowa. Obecnie wiadomo, że na rozwój raka piersi wpływa wiele różnych czynników. Czynniki ryzyka raka piersi ze względu na możliwość zmiany uwarunkowań osobniczych można podzielić na czynniki modyfikowalne i niemodyfikowalne. Czynniki modyfikowalne stanowią cechy, w przypadku których możliwe staje się bezpośrednie lub pośrednie działanie minimalizujące ryzyko rozwoju choroby. Z kolei czynniki niemodyfikowalne to cechy, wobec których nie można podjąć żadnych interwencji w celu zmniejszenia prawdopodobieństwa wystąpienia raka piersi w przyszłości [86, 87].

**Tabela 2.** Modyfikowalne i niemodyfikowalne czynniki ryzyka raka piersi [88].

| <b>Czynniki modyfikowalne</b>           | <b>Czynniki niemodyfikowalne</b>  |
|---|-----------------------------------|
| Hormonalna terapia wieku menopauzalnego | Płeć żeńska                       |
| Doustna antykoncepcja                   | Wiek > 50 lat                     |
| Nadwaga/otyłość                         | Historia rodzinna                 |
| Palenie tytoniu                         | Mutacje genetyczne                |
| Nadmierne spożywanie alkoholu           | Rasa/pochodzenie etniczne         |
| Brak aktywności fizycznej               | Czas i okres miesiączkowania      |
| Brak karmienia piersią                  | Gęstość tkanki gruczołowej        |
| Ilość porodów                           | Wcześniejsza historia raka piersi |
| Narażenie na chemikalia                 | Nienowotworowe choroby piersi     |

## 2.5. Klasyfikacja raka piersi

Rak piersi jest wybitnie heterogenną grupą chorób o zróżnicowanym wyglądzie morfologicznym, fenotypie molekularnym, zachowaniu biologicznym, a także odmiennej odpowiedzi na leczenie. W celu uporządkowania i usystematyzowania niejednorodnych postaci raka piersi opracowano szereg algorytmów i systemów klasyfikacji raka piersi. Pełna klasyfikacja obejmuje ocenę typu histologicznego, stopnia złośliwości histologicznej, stopnia zaawansowania klinicznego, statusu receptorów hormonalnych oraz markera proliferacji Ki67. Diagnostyka i rozpoznanie patomorfologiczne raka piersi powinno opierać się na fragmencie tkanki pobranej za pomocą biopsji gruboigłowej i zostać ustalone zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia. Dokładne rozróżnienie poszczególnych podtypów jest niezwykle istotne ze względu na odmienne rokowanie oraz determinację wyboru odpowiedniego, spersonalizowanego leczenia [71, 89–93].



Rycina 9. Rozpoznanie i klasyfikacja raka piersi [91–93].

### 2.5.1. Klasyfikacja histologiczna

Klasyfikacja histologiczna uwzględnia mikroskopową analizę cech morfologicznych komórek nowotworowych takich jak wielkość, kształt oraz architektura, stosując kryteria określone przez wytyczne WHO. Identyfikacja histologicznego typu raka piersi opiera się na rutynowym barwieniu hematoksyliną-eozyną i dokładnej analizie mikroskopowej bioptatu tkanki piersiowej uzyskanej podczas zabiegu biopsji gruboigłowej. Analiza patomorfologiczna dostarcza informacji na temat tekstury, rozmiaru, kształtu, organizacji, interakcji i układu przestrzennego jąder. Dodatkowo analizowana jest zmienność wewnątrz, gęstość i ogólna struktura i architektura tkanki. W szczególności istotne są informacje dotyczące cech jąder, które są niezbędne do rozróżnienia komórek nienowotworowych od komórek rakowych. Natomiast informacje dotyczące struktury tkanki są istotne dla rozróżnienia komórek raka *in situ* od inwazyjnych. Analiza histologiczna pozwala również ustalić czy wykryty guz jest guzem pochodzącym z przewodów czy zrazików oraz ocenić czy zmiana nowotworowa ogranicza się do nabłonkowej części piersi czy nacieka otaczający go zręb. Według najnowszej edycji klasyfikacji WHO, raki piersi został podzielony na 19 różnych głównych podtypów histologicznych. Klasyfikacja uwzględnia łagodne i złośliwe nowotwory piersi pochodzenia nabłonkowego, mezenchymalnego, włóknisto-nabłonkowego, nowotwory neuroendokryne, nowotwory brodawki piersi i guzy otoczki sutkowej, a także chłoniaki piersi i zmiany przerzutowe w gruczole sutkowym. Najczęstszą postacią nowotworu piersi jest inwazyjny rak bez specjalnego typu (NST, ang. *invasive carcinoma of no special type*), dawniej nazywany inwazyjnym rakiem przewodowym, występujący z częstością 70–80% wszystkich przypadków raka piersi. Podtyp ten charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem pod względem morfologii komórek nowotworowych oraz obecnością struktur kanalikowych lub gruczołowych, jednakże rozpoznawany jest jako nowotwór, którego nie można zaklasyfikować do żadnego ze specjalnych typów histologicznych. Drugim pod względem częstości występowania jest inwazyjny rak zrazikowy (ILC, ang. *invasive lobular carcinoma*), obejmujący około 10% wszystkich zachorowań. Ta postać nowotworu jest zaliczana do specjalnych typów raka piersi i charakteryzuje się małą różnorodnością komórek nowotworowych, bardzo częstą ekspresją receptorów steroidowych i niezwykle rzadką nadekspresją receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2, ang. *human epidermal receptor 2*). Do pozostałych najczęstszych

specjalnych podtypów raka piersi należą: rak metaplastyczny, rak śluzowy, rak sitowaty oraz rak cewkowy [88, 92, 94–98].

**Tabela 3.** Uproszczona klasyfikacja histologiczna raka piersi według wytycznych WHO z 2019 r. [92].

| Zmiany łagodne/prekursorowe    | Zmiany inwazyjne/ nowotwory naciekające |
|--------------------------------|---|
| Rak przewodowy in situ         | Inwazyjny rak bez specjalnego typu      |
| Rak zrazikowy in situ          | Inwazyjny rak zrazikowy                 |
| Zwykła hiperplazja przewodowa  | Rak cewkowy                             |
| Zmiany walcowatokomórkowe      | Rak sitowaty                            |
| Atypowa hiperplazja przewodowa | Rak śluzowy                             |
| Zmiany brodawkowe              | Rak metaplastyczny                      |
| Gruczolistość i gruczolaki     | Rak onkocytarny                         |
| Inne                           | Inne                                    |

### 2.5.2. Ocena stopnia złośliwości histologicznej

Ocena stopnia złośliwości histologicznej (*G*, ang. *grade*) została wprowadzona ze względu na znaczne zróżnicowanie cech biologicznych nowotworów piersi w obrębie tego samego typu histologicznego przy braku charakterystycznych cech morfologicznych. Rekomendowaną klasyfikacją stosowaną do prawidłowej oceny stopnia złośliwości histologicznej jest zalecana przez WHO klasyfikacja Blooma-Richardsona-Scarffa w modyfikacji Elstona-Ellisa. System klasyfikacji stopnia złośliwości histologicznej pozwala określić stopień homologii analizowanych komórek nowotworowych z komórkami prawidłowymi. Oparty jest na mikroskopowej ocenie trzech elementów morfologicznych: (1) stopnia zróżnicowania wyrażonego przez ilość utworzonych kanalików lub gruczołów; (2) pleomorfizmu jądrowego wyrażonego poprzez porównanie jąder komórek nowotworowych z sąsiadującymi prawidłowymi komórkami nabłonka piersi; oraz (3) aktywności mitotycznej wyrażonej przez liczbę figur mitotycznych w przeliczeniu na 10 pól widzenia. Każda cecha jest oceniana

w systemie trójstopniowym, a ostateczny stopień G1, G2 lub G3 jest ustalany poprzez dodanie indywidualnych ocen. Stopień złośliwości histologicznej guza odzwierciedla potencjalną agresywność raka piersi i jest silnym czynnikiem prognostycznym [89, 97–99].

**Tabela 4.** Ocena stopnia złośliwości histologicznej raka piersi [92, 98, 100].

| Cecha  | Punktacja |
|--|-----------|
| <b>Stopień formowania cewek i gruczołów</b>                          |           |
| >75%   | 1         |
| 10-75%   | 2         |
| <10%   | 3         |
| <b>Pleomorfizm jądrowy (stopień atypii jądrowej)</b>                 |           |
| Małe, regularne, jednorodne  | 1         |
| Umiarkowanie powiększone i niejednorodne                             | 2         |
| Wyraźnie pleomorficzne   | 3         |
| <b>Liczba figur podziałowych komórek raka (aktywność mitotyczna)</b> |           |
| Zależy od wielkości pola widzenia mikroskopu                         | 1-3       |
| <b>Stopień złośliwości histologicznej</b>                            |           |

### 2.5.3. Klasyfikacja stopnia zaawansowania klinicznego

Najszerzej stosowanym systemem oceny stopnia zaawansowania raka piersi jest system TNM opublikowany przez American Joint Committee on Cancer (AJCC). System klasyfikacji TNM w swojej ocenie uwzględnia następujące cechy anatomiczne: wielkość guza (T); stan regionalnych węzłów chłonnych (N) oraz obecność przerzutów do odległych węzłów chłonnych i/lub narządów (M) do odległych węzłów chłonnych i/lub narządów. Wielkość guza ocenia się mikroskopowo, mierząc największą średnicę guza, z kolei obecność przerzutów wykrywa się za pomocą badań obrazowych, a następnie weryfikuje przy użyciu biopsji. Prawidłowa ocena wszystkich elementów klasyfikacji TNM pozwala określić odpowiedni stopień zaawansowania nowotworu piersi, który obecnie stanowi najważniejszy czynnik prognostyczny. Precyzyjne ustalenie odpowiedniego stopnia zaawansowania raka piersi jest kluczowe podczas podejmowania decyzji dotyczących kontroli choroby miejscowej, a także dla

określenia wartości leczenia systemowego. Generalnie wyróżnia się pięć stopni zaawansowania klinicznego raka piersi od stopnia 0 do stopnia IV, przy czym stopień 0 opisuje nowotwory nieinwazyjne, które ograniczają się do pierwotnej lokalizacji, a stopień IV opisuje nowotwory inwazyjne o charakterze przerzutowym [94, 97, 98].

Ponadto, w najnowszym, ósmym wydaniu klasyfikacji AJCC, oprócz zachowania tradycyjnej klasyfikacji anatomicznej, uwzględniono również dodatkowe zmienne biologiczne i molekularne. Wprowadzono prognostyczny system oceny stopnia zaawansowania, który uwzględnia stopień zaawansowania nowotworu oraz status receptora estrogenowego (ER, ang. *estrogen receptor*), progesteronowego (PR, ang. *progesterone receptor*) oraz status onkogenu HER2 w celu lepszego odzwierciedlenia i przewidywania rokowania raka piersi [101].

**Tabela 5.** Klasyfikacja oceny stopnia zaawansowania [92].

| Stopień | Subkategoria | TNM       | Opis   |
|---------|--------------|-----------|--|
| 0       |              | Tis       | Rak <i>in situ</i>   |
|         |              | N0        |  |
|         |              | M0        |  |
| I       | A            | T1        | Guz ≤ 2 cm i węzły chłonne niezajęte   |
|         |              | N0        |  |
|         | B            | M0        | Guz nieobecny lub guz ≤ 2 cm z 1-3 mikroprzerzutami do regionalnych węzłów chłonnych |
|         |              | T0 lub T1 |  |
| II      | A            | N1        | Guz nieobecny lub guz ≤ 2 cm z 1-3 przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych      |
|         |              | M0        |  |
|         |              | T2        |  |
|         | N0           |           |  |
|         | M0           |           |  |
|         | B            | T2        | Guz > 2 cm i ≤ 5 cm z 1-3 przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych               |
| N1      |              |           |  |
| M0      |              |           |  |
|         |              | T3        | Guz > 5 cm z niezajętymi węzłami chłonnymi   |
|         | N0           |           |  |
|         |              | M0        |  |

|     |   |                          |   |
|-----|---|--------------------------|---|
| III | A | T0-T3<br>N2<br>M0        | Guz każdej wielkości z 4-9 przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych   |
|     |   | T3<br>N1<br>M0           | Guz > 5 cm z 1-3 przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych   |
|     | B | T4<br>N0-N2<br>M0        | Guz każdej wielkości, naciekający ścianę klatki piersiowej i skórę, z < 9 przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych                              |
|     | C | Każde T<br>N3<br>M0      | Obecny guz z ≥ 10 przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych lub do węzła nadobojczykowego lub > 3 do węzłów pachowych i piersiowych wewnętrznych |
| IV  |   | Każde T<br>Każde N<br>M1 | Obecne przerzuty do odległych narządów  |

#### 2.5.4. Klasyfikacja molekularna

W dobie współczesnej medycyny, rutynowo oznaczane elementy badania patomorfologicznego wydają się niewystarczające do prognozowania przebiegu klinicznego raka piersi, co utrudnia podjęcie właściwych decyzji terapeutycznych. Zróżnicowany przebieg kliniczny nowotworów o podobnych cechach morfologicznych wynika z ich odmiennego profilu genowego. Grupy genów odpowiedzialne za segregację podtypów molekularnych raka piersi to geny związane z ekspresją receptorów estrogenowych, progesteronowych, HER2 oraz regulatora proliferacji komórek Ki67. Badanie ekspresji tych genów pozwoliło na identyfikację pięciu podtypów molekularnych raka piersi, takich jak: luminalny A, luminalny B HER2 dodatni, luminalny B HER2 ujemny, Nieluminalny HER2 dodatni oraz potrójnie ujemny. Podtypy te, różniące się wzorcami ekspresji genów, odzwierciedlają indywidualny fenotyp, rokowanie oraz planowanie i determinację odpowiedniego leczenia systemowego [96, 98].

Klasyfikacja molekularna została pierwotnie zdefiniowana na podstawie profilowania ekspresji genów przy użyciu techniki mikromacierzy cDNA, natomiast w rutynowej diagnostyce określenie odpowiednich podtypów biologicznych oparte jest o wykorzystanie prostszych technik immunohistochemicznych (IHC, ang. *immunohistochemistry*) analizujących status receptora estrogenowego, progesteronowego, HER2 oraz obecność markera proliferacji Ki67 [94, 96].

Typ luminalny A jest najczęściej występującym podtypem molekularny, stanowiącym około połowę nowo zdiagnozowanych przypadków raka piersi. Charakteryzuje się wysoką ekspresją genów związanych z aktywnością receptorów estrogenowych i jednocześnie niską ekspresją genów związanych z proliferacją oraz genów związanych z ekspresją receptora HER2. Według ostatniej aktualizacji St. Gallen z 2013 roku profil immunohistochemiczny tego podtypu określono jako: ER(+) ( $\geq 1\%$ ), wysoka ekspresja PR ( $\geq 20\%$ ), HER2(-) ( $\leq 10\%$ ) oraz niski poziom Ki67 ( $< 20\%$ ). Ponadto nowotwory w tym podtypie mają cechy nabłonkowych komórek światła przewodów (luminalnych), takie jak wysoka ekspresja cytokeratyny. Luminalne nowotwory piersi typu A obejmują szeroką gamę wariantów o niskim stopniu złośliwości histologicznej, takie jak rak NST, cewkowy, sitowaty, śluzowy oraz klasyczny ILC. Na ogół nowotwory luminalne A wiążą się z bardzo korzystnym rokowaniem, łagodniejszym przebiegiem klinicznym i wykazują mniejszą częstość zajęcia węzłów chłonnych. Co więcej, ze względu na obecność receptorów hormonalnych (ER oraz PR), pacjentki z tym nowotworem odnoszą korzyści z terapii hormonalnych, zarówno z użyciem selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych, jak i inhibitorów aromatazy [96, 98].

Typ luminalny B odpowiada za około 20–30% przypadków inwazyjnego raka piersi. Podtyp ten można podzielić immunofenotypowo na rak luminalny B HER2 ujemny: ER(+) ( $\geq 1\%$ ), PR(-) lub  $< 20\%$ , HER2(-) ( $\leq 10\%$ ) i wysoki poziom Ki67 ( $\geq 20\%$ ); lub rak luminalny B HER2 dodatni: ER(+) ( $\geq 1\%$ ), HER2(+) ( $> 10\%$ ) oraz dowolny poziom PR i Ki67. Ta jednostka molekularna zazwyczaj charakteryzuje się umiarkowanym stopniem złośliwości histologicznej, obejmującym większość nowotworów NST. Ponadto, rak luminalny B wiąże się z mniej korzystnym rokowaniem oraz z większym prawdopodobieństwem wznowy miejscowo-regionalnej w porównaniu z rakiem luminalny A. Biorąc pod uwagę, że podtyp luminalny B jest bardziej agresywną postacią hormonozależnego raka piersi, stosowana terapia hormonalna wymaga dodatkowej formy terapii wspomagającej, w tym chemioterapii w przypadku nowotworów HER2(+/-) lub terapii celowanej w przypadku HER2(+) [96].

Typ Nieluminalny HER2 dodatni stanowi od 15% do 20% nowo zdiagnozowanych przypadków raka piersi. Podtyp ten charakteryzuje się wysoką ekspresją HER2 ( $> 10\%$ ), ujemną ekspresją ER ( $< 1\%$ ) i PR ( $< 20\%$ ) oraz wysoką ekspresją Ki67 ( $> 20\%$ ). Oprócz charakterystyki immunofenotypowej rutynowo stosowanej do oceny statusu HER2 w raku piersi, do oceny amplifikacji genów wykorzystuje również technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH, ang. *fluorescent in situ hybridization*). Zgodnie z najnowszymi wytycznymi praktyki klinicznej



American Society of Clinical Oncology do immunohistochemicznej oceny statusu receptora HER2 stosuje się 4-stopniową skalę. Jeśli wynik IHC wykazuje silne wybarwienie błonowe (4+), wówczas nowotwory uznaje się dodatnie pod względem HER2. W przypadku zaobserwowania barwienia o niskiej intensywności (0 lub 1+) wynik uznaje się za ujemny. Z kolei w przypadku wartości granicznej świadczącej o umiarkowanej intensywności wybarwienia błonowego (2+) konieczne jest wykonanie dodatkowej analizy metodą FISH w celu potwierdzenia tego wyniku. Nadekspresja HER2 występuje prawie wyłącznie w wariantcie pleomorficznym ILC. Amplifikacja genu i podwyższona ekspresja białka HER2 powiązana jest z guzami o wyższym stopniu złośliwości histologicznej, wysokim indeksie proliferacyjnym i skłonności do powstawania przerzutów i w konsekwencji gorszym rokowaniem. Niemniej jednak, nowotwory nieluminalne HER2 dodatnie mogą dobrze reagować na leki blokujące aktywność HER2, zwłaszcza humanizowane przeciwciała monoklonalne (Trastuzumab) oraz molekularne inhibitory receptorowej kinazy tyrozynowej (Lapatinib) [92, 96].

Ostatnim typem biologicznym jest rak potrójnie ujemny, zwany także bazalnym, stanowiący od 10% do 20% wszystkich przypadków raka piersi. Podtyp ten, jak sama nazwa wskazuje, charakteryzuje się brakiem ekspresji receptorów hormonalnych ER(-) (<1%) i PR(-) (<20%) oraz onkoproteiny HER2(-) ( $\leq 10\%$ ). Ponadto jest silnie proliferacyjnym nowotworem z wysokim wskaźnikiem Ki67 (> 30%). Większość nowotworów potrójnie ujemnych objawia się typem histologicznym NST, jednakże obejmują one także odmiany raka rdzeniastego, metaplastycznego i apokrynowego. Potrójnie ujemny rak piersi jest jednym z najtrudniejszych do wyleczenia nowotworem. Podtyp ten występuje na ogół częściej u pacjentek z mutacjami *BRCA1* oraz u młodych kobiet i charakteryzują się wysokim stopniem złośliwości histologicznej, występowaniem oporności na leczenie oraz wyższym ryzykiem wznowy miejscowo-regionalnej oraz nawrotu ogólnoustrojowego [96, 102, 103].

**Tabela 6.** Charakterystyka molekularnych podtypów raka piersi [96].

| Podtyp molekularny           | Luminalny A    | Luminalny B                     |   | Nieluminalny HER2                 | Potrójnie ujemny |
|------------------------------|----------------|---------------------------------|---|-----------------------------------|------------------|
|                              |                | HER2 ujemny                     | HER2 dodatni  |                                   |                  |
| <b>Biomarkery</b>            | ER(+)          | ER(+)                           | ER(+)   | ER(-)                             | ER(-)            |
|                              | PR(+)          | PR(-)                           | PR(-/+)   | PR(-)                             | PR(-)            |
|                              | HER2(-)        | HER2(-)                         | HER2(+)   | HER2(+)                           | HER2(-)          |
|                              | Ki67 niski     | Ki67 wysoki                     | Ki67 każdy  | Ki67 wysoki                       | Ki67 wysoki      |
| <b>Częstość (%)</b>          | 40-50          | 20-30                           |   | 15-20                             | 10-20            |
| <b>Grade</b>                 | G1             | G2                              |   | G3                                | G3               |
| <b>Rokowanie</b>             | Korzystne      | Umiarkowane                     |   | Niekorzystne                      | Niekorzystne     |
| <b>Odpowiedź na leczenie</b> | Hormonoterapia | Hormonoterapia<br>Chemioterapia | Hormonoterapia<br>Chemioterapia<br>Terapia celowana | Terapia celowana<br>Chemioterapia | Chemioterapia    |

Ocena ekspresji receptorów steroidowych: estrogenowych i progesteronowych oraz receptora HER2 jest szczególnie istotna ze względu na istotną wartość zarówno prognostyczną, jak i predykcyjną. Obecność tych receptorów pozwala przewidzieć długoterminowy wynik terapii hormonalnej, dlatego są one częściej stosowane jako marker predykcyjny, a rzadziej jako marker prognostyczny. Istnieją zasadnicze różnice pomiędzy podtypami molekularnymi raka piersi pod względem częstości występowania, odpowiedzi na leczenie, postępu choroby, przeżycia i cech obrazowania. Nowotwory luminalne A mają najkorzystniejsze rokowanie ze wszystkich podtypów raka piersi, podczas gdy nowotwory luminalne B, wzbogacone w HER2 i nowotwory potrójnie ujemne cechują się gorszym przebiegiem klinicznym. Przeżycie raka piersi różni się także w zależności od podtypu nowotworu. Wskaźniki 5-letniego przeżycia względnego wynoszą:

- 94% dla HR+/HER2
- 91% dla HR+/HER2+
- 85% dla HR-/HER2+
- 77% dla HR-/HER2

Co ważne, 5-letnie przeżycie względne wynosi 90% lub więcej dla wszystkich podtypy, jeśli zostaną zdiagnozowane na etapie zlokalizowanym [94, 98, 104, 105].

## 2.6. Leczenie raka piersi

Leczenie raka piersi charakteryzuje się multidyscyplinarnym podejściem, a jego odpowiedni dobór jest determinowany przez szereg różnych czynników kliniczno-molekularnych, takich jak stopień zaawansowania klinicznego, status receptorów hormonalnych, status receptora HER2 oraz ogólny stan pacjentki. Proponowane metody leczenia w przebiegu raka piersi obejmują przede wszystkim: zabieg chirurgiczny, radioterapię, chemioterapię, hormonoterapię terapię celowaną oraz immunoterapię. Biorąc za kryterium miejsce działania terapii, leczenie przeciwnowotworowe można podzielić na leczenie miejscowe oraz systemowe. Leczenie miejscowe oparte jest na interwencji skierowanej bezpośrednio na obszar guza i obejmuje zarówno zabieg chirurgiczny jak i radioterapię. Z kolei leczenie systemowe polega na podaniu leków ogólnoustrojowo i obejmuje chemioterapię, hormonoterapię, immunoterapię oraz leczenie systemowe. Leczenie systemowe może mieć charakter adjuwantowy lub neoadjuwantowy. Obie te strategie mają na celu poprawę wyników terapeutycznych w zależności od konkretnej sytuacji klinicznej pacjentki. Neoadjuwantowa terapia systemowa jest formą terapii stosowaną przed zabiegiem operacyjnym u kobiet z dużymi guzami, u których preferowane jest zmniejszenie masy nowotworu w celu ułatwienia przeprowadzenia skutecznego chirurgicznego usunięcia guza lub zabiegu oszczędzającego piersi zamiast mastektomii. Natomiast leczenie adjuwantowe, inaczej zwane uzupełniającym, stosowane jest po chirurgicznym usunięciu guza w celu zmniejszenia ryzyka nawrotu choroby [77, 94, 97, 106].

### 2.6.1. Zabieg chirurgiczny

Fundamentalną formą leczenia raka piersi jest chirurgiczne usunięcie guza w obrębie tkanek zdrowych, będące podstawą dla dalszych ukierunkowanych terapii, w tym radioterapii, chemioterapii oraz radioterapii. Istnieją dwa główne rodzaje zabiegów chirurgicznych umożliwiających usunięcie tkanek nowotworowych piersi. Należą do nich chirurgia oszczędzająca pierś (BCS, ang. *breast-conserving surgery*) oraz mastektomia. W obrębie mastektomii wyróżnia się 5 różnych metod usunięcia zmienionej nowotworowo tkanki. Należą do nich: mastektomia całkowita, zmodyfikowana radykalna mastektomia (MRM, ang. *modified-radical mastectomy*), mastektomia radykalna, mastektomia częściowa oraz mastektomia z zaoszczędzeniem kompleksu otoczek–brodawka (NSM, ang. *nipple-sparing*

*mastectomy*). Obecnie najpowszechniejszą formą mastektomii jest mastektomia całkowita, która obejmuje całościowe usunięcie piersi z zachowaniem powięzi piersiowej, często bez konieczności całkowitego wycięcia węzłów pachowych. Kolejną dość popularną metodą jest zmodyfikowana radykalna mastektomia. Procedura ta polega na eliptycznym nacięciu obejmującym kompleks brodawkowo-otoczkowy i usunięciu całej tkanki piersiowej, mięśnia piersiowego mniejszego wraz z powięzią piersiową oraz wycięciu pachowych węzłów chłonnych. Ten rodzaj zabiegu wykonuje się w celu ułatwienia i zapewnienia kompletności oczyszczenia pachowego przypadku bardziej inwazyjnych nowotworów, w przebiegu których komórki nowotworowe rozprzestrzeniły się do węzłów chłonnych. W przypadku mastektomii, często konieczne jest przeprowadzenie późniejszej rekonstrukcji piersi. Natomiast BCS umożliwia usunięcie guza wraz z marginesem zdrowych komórek wraz z zabiegiem diagnostyczno-leczniczym w obrębie układu chłonnego dołu pachowego lub wartowniczego węzła chłonnego z jednoczesnym zachowaniem nienaruszonej tkanki piersi, często w połączeniu z technikami chirurgii plastycznej. Chociaż BCS wydaje się być znacznie korzystniejsza dla pacjentek, to u pacjentek leczonych tą techniką często występuje tendencja do dalszej konieczności całkowitej mastektomii. Niemniej jednak, zastosowanie BCS wiąże się przede wszystkim ze znacznie lepszym efektem kosmetycznym, zmniejszeniem obciążenia psychicznego pacjentki, a także zmniejszeniem powikłań pooperacyjnych. Według wytycznych Europejskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej, wybór odpowiedniej formy terapii chirurgicznej dla pacjentek z wczesnym rakiem piersi uzależniony jest od wielkości guza, możliwości wykonania operacji, fenotypu klinicznego oraz chęci pacjentki do zachowania piersi [88, 107–111].

Strategia leczenia chirurgiczne oraz klasyfikacja do poszczególnych zabiegów jest determinowana przez stopień zaawansowania klinicznego według klasyfikacji TNM i obejmuje następujące algorytmy:

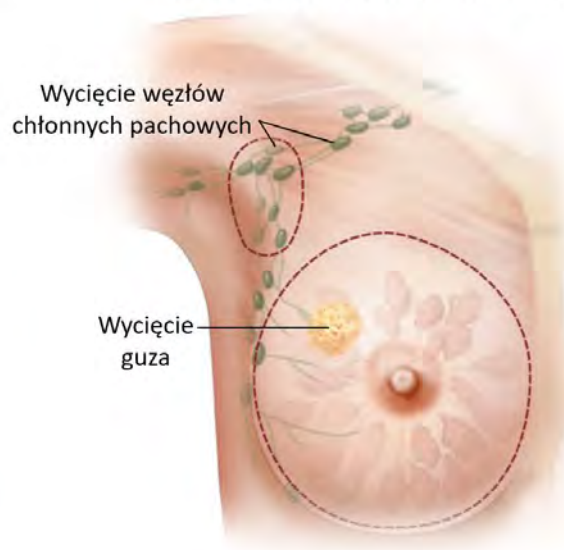
- Chirurgia oszczędzająca pierś jest rekomendowaną metodą leczenia u pacjentek z rakiem piersi w I i II stopniu zaawansowania;
- Chirurgia oszczędzająca jest możliwa u pacjentek, u których wykonanie tego zabiegu pozwoli na całkowitą eliminację raka piersi;

- Chirurgię oszczędzającą można wykonać u pacjentek, u których proporcje pomiędzy objętością pierwotnego guza a objętością piersi umożliwiają osiągnięcie satysfakcjonującego efektu kosmetycznego;
- Mastektomia jest zalecaną metodą leczenia u pacjentek z rakiem piersi w I i II stopniu zaawansowania, które nie kwalifikują się do chirurgii oszczędzającej lub które nie wyrażają na nią zgody;
- Czynniki dyskwalifikującymi do wdrożenia chirurgii oszczędzającej są między innymi: brak możliwości uzyskania wystarczającego marginesu wycięcia guza, zbyt duży guz w stosunku do objętości piersi, zapalny rak piersi oraz pierwszy trymestr ciąży;
- W przypadku zastosowania w pierwszej kolejności systemowego leczenia neoadjuwantowego, chirurgia oszczędzająca pierś może zostać przeprowadzona pod warunkiem dobrej odpowiedzi na leczenie przedoperacyjne;
- Z kolei wystąpienie progresji w trakcie terapii neoadjuwantowej lub brak możliwości przeprowadzenia radioterapii uzupełniającej stanowi bezwzględne wskazanie do wykonania mastektomii [112].

### Chirurgia oszczędzająca pierś



### Mastektomia całkowita



**Rycina 10.** Różnica pomiędzy chirurgią oszczędzającą pierś a mastektomią całkowitą (w modyfikacji własnej) [111, 113].

### 2.6.2. Radioterapia

Radioterapia jest leczeniem miejscowym polegającym na bezpośrednim naświetlaniu klatki piersiowej lub samej piersi przy wykorzystaniu wysoko energetycznego promieniowania jonizującego w celu eradykacji wszelkich mikroskopijnych złogów nowotworowych pozostałych po operacji i minimalizacji ryzyka nawrotu raka piersi. Wybór rodzaju radioterapii zależy od rodzaju przeprowadzonego wcześniej zabiegu lub konkretnej sytuacji klinicznej. Do najpowszechniejszych technik zalicza się radioterapię piersi, będącą nieodzownym elementem po przeprowadzeniu BCS, radioterapię ściany klatki piersiowej, wdrażaną zwykle po mastektomii oraz tak zwany „boost”, czyli wzmocnienie dodatkową dawką promieniowania w miejsce łoża po guzie jako uzupełnienie radioterapii piersi po BCS. Standardowe dawki stosowane w adjuwantowym napromieniowaniu miejscowym wynoszą 45–50 Gy podane w 25–28 frakcjach przez okres 5 tygodni, uzupełnione u części pacjentek dodatkowym boostem w dawce 10-16 Gy z dawką frakcyjną 2 Gy. W przypadku inwazyjnego raka piersi, radioterapia uzupełniająca z boostem zalecana jest u pacjentek w wieku poniżej 50 lat z nowotworem o dowolnym stopniu złośliwości histologicznej oraz u pacjentek w wieku 51– 70 lat z rakiem o wysokim stopniu złośliwości lub z dodatnim marginesem chirurgicznym. Dla nowotworów *in situ* radioterapia uzupełniająca z boostem jest zalecana w przypadku pacjentek z rakiem o wysokim stopniu złośliwości, u pacjentek przed menopauzą, u pacjentek w wieku <50 lat oraz w przypadku obecności guzów > 2,5 cm lub marginesów chirurgicznych <2 cm. Neoadjuwantowa radioterapia jest rzadko stosowana, aczkolwiek jest korzystna w przypadku przerzutowego lub nieoperacyjnego raka piersi [77, 88, 93, 114, 115].

### 2.6.3. Chemioterapia

Chemioterapia jest systemową metodą leczenia raka piersi i może mieć charakter neoadjuwantowy lub adjuwantowy. Wybór najodpowiedniejszej terapii jest ustalany indywidualnie w zależności od cech kliniczno-patologicznych nowotworu piersi. Chemioterapia jest standardem opieki u pacjentek z zajęтыми węzłami chłonnymi lub z guzem większym niż 1 cm. Chemioterapia o charakterze uzupełniającym po zabiegu chirurgicznym jest na ogół zalecana u pacjentek z wysokim ryzykiem nawrotu choroby nowotworowej. Chemioterapię neoadjuwantową stosuje się w przypadku: (1) miejscowo zaawansowanego raka piersi; (2) zapalnego raka piersi; (3) w celu zmniejszenia wielkości i stopnia

zaawansowania dużych guzów; (4) w celu umożliwienia przeprowadzenia chirurgii oszczędzającej lub (5) w przypadku małych guzów z podtypami molekularnymi o gorszym rokowaniu (HER2 dodatni lub potrójnie ujemny). Celem chemioterapii jest zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych i wzrostu guza, zapobiegając w ten sposób inwazji i przerzutom. Hamowanie wzrostu nowotworu może zachodzić na kilku poziomach w obrębie komórki i jej otoczenia. Tradycyjne środki chemioterapeutyczne wpływają przede wszystkim na syntezę białek i funkcje komórek nowotworowych poprzez zaburzanie syntezy DNA, RNA i białek. Gdy ingerencja w syntezę lub funkcję białek jest wystarczająca, prowadzi to do śmierci komórki w wyniku bezpośredniego działania środka chemioterapeutycznego lub poprzez zainicjowanie apoptozy. Ze względu na mechanizm działania leków cytostatycznych stosowanych w chemioterapii raka piersi wyróżnia się leki alkilujące, antracykliny oraz taksany. Oprócz skutecznego działania przeciwnowotworowego, chemioterapia wywołuje szereg skutków ubocznych, wynikających z wpływu leków cytostatycznych również na prawidłowe komórki [88, 116–119].

**Tabela 7.** Rodzaje cytostatyków stosowanych w chemioterapii raka piersi [119].

| Leki cytostatyczne   | Mechanizm działania   | Skutki uboczne  |
|--|---|---|
| <b>Leki alkilujące:</b><br>Karboplatyna<br>Cyklofosfamid                     | Kowalencyjnie wiążą się z DNA, zakłócając jego prawidłowe funkcje                                 | Supresja szpiku kostnego, zaburzenia elektrolitowe, nudności, wymioty                           |
| <b>Antracykliny:</b><br>Doksorubicyna (Adriamycyna)<br>Epirubicyna (Ellence) | Hamują replikację DNA oraz generują wolne rodniki, które dodatkowo uszkodzają komórki nowotworowe | Ostra i opóźniona kardiotoxycywność, łysienie, supresja szpiku, nudności, wymioty               |
| <b>Taksany:</b><br>Docetaksel (Taxotere)<br>Paklitaksel (Taxol)              | Hamują podział komórek nowotworowych poprzez stabilizację mikrotubul podczas mitozy               | Łysienie, zaczerwienienie skóry głowy, supresja szpiku, nudności, wymioty, biegunka, neuropatia |

Schematy leczenia oparte na taksanach stosuje się przede wszystkim w przypadku podtypów raka piersi o mniejszej złośliwości i inwazyjności, z kolei antracykliny włącza się do algorytmów leczenia ukierunkowanych na nowotwory potrójnie ujemne z zajęтыми węzłami chłonnymi. Obecnie stosuje się schematy wielolekowe oparte na jednoczesnym podawaniu

kilku (dwóch, trzech) cytostatyków. Wybór odpowiedniego leku ma ogromne znaczenie, ponieważ różne podtypy molekularnego raka piersi różnie reagują na przedoperacyjną chemioterapię. Chemioterapia przedoperacyjna jest porównywalnie skuteczna do chemioterapii pooperacyjnej [88, 119].

**Tabela 8.** Schemat i dawkowanie chemioterapii w leczeniu raka piersi [116].

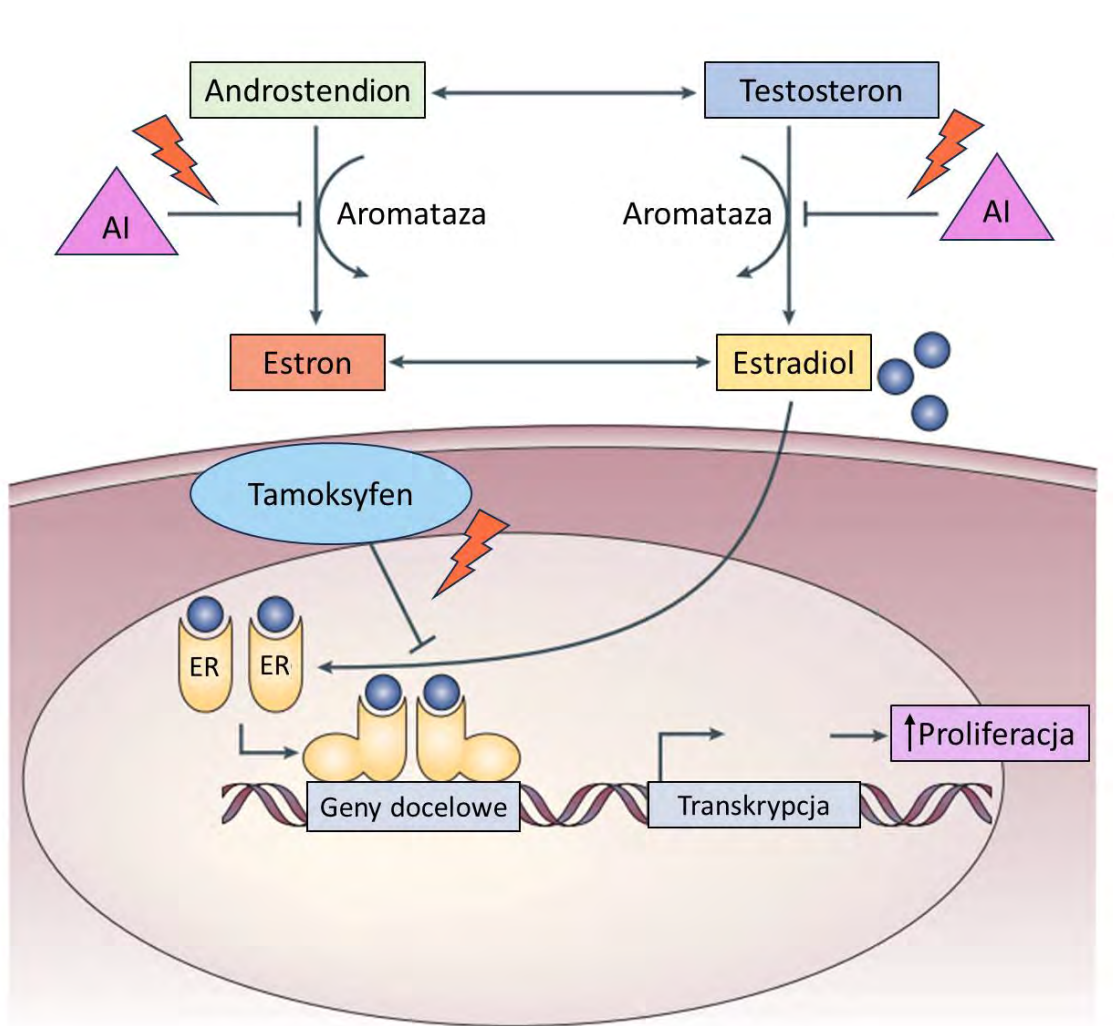
|                     | Lek                         | Schemat podania   |
|---------------------|-----------------------------|---|
| <b>Antracykliny</b> | Doksorubicyna (Adriamycyna) | Dożylnie co 14 do 21 dni przez 4 do 6 cykli; stosowany w połączeniu z taksanem (docetakselem lub paklitakselem), cyklofosfamidem i/lub fluorouracylem                     |
|                     | Epirubicyna (Ellence)       | Dożylnie w pojedynczej dawce 1. dnia lub w dawkach podanych 1. i 8. dnia, co 21 do 28 dni przez 3 do 8 cykli; stosowany w połączeniu z cyklofosfamidem lub fluorouracylem |
| <b>Taksany</b>      | Docetaksel (Taxotere)       | Dożylnie co 21 dni przez 3 do 4 cykli; stosowany w połączeniu z doksorubicyną, epirubicyną, cyklofosfamidem i/lub fluorouracylem  |
|                     | Paklitaksel (Taxol)         | Dożylnie co 7 do 21 dni przez 4 do 12 cykli; stosowany w skojarzeniu z doksorubicyną i cyklofosfamidem  |

#### 2.6.4. Hormonoterapia

Hormonoterapia, stosowana jako terapia neoadjuwantowa lub uzupełniająca, stanowi złoty standard terapeutyczny u pacjentek z podtypem luminalnym, wykazującym ekspresję receptorów hormonalnych. Jest skuteczna w przypadku wystąpienia nawrotu lub przerzutów raka piersi. Ponieważ estrogen i progesteron są głównymi regulatorami wzrostu i różnicowania tkanki piersi, blokowanie ich aktywności za pomocą hormonoterapii jest powszechnie stosowane jako jedna ze skutecznych metod leczenia raka piersi. Głównym celem hormonoterapii jest obniżenie poziomu estrogenów i konsekwentne hamowanie estrogenowej stymulacji komórek raka piersi. Leki stosowane w ramach hormonoterapii obejmują selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERM, ang. *selective estrogen receptor modulators*), inhibitory aromatazy (AI, ang. *aromatase inhibitors*) oraz leki hamujące czynność jajników. SERM to syntetyczne związki niesteroidowe, które wiążą się z receptorami estrogenowymi (ER) i mogą na różne sposoby modulować jego zdolności transkrypcyjne



w różnych docelowych tkankach estrogenowych. Głównym przedstawicielem tej grupy leków powszechnie stosowanym w leczeniu raka piersi jest tamoksyfen, który działa na zasadzie kompetycyjnego wiązania się z ER wewnątrz komórek nowotworowych, co w konsekwencji blokuje i uniemożliwia oddziaływanie estrogenu z ER. Skutkiem tego mechanizmu jest zahamowanie estrogenozależnej proliferacji komórek nowotworowych piersi. Z kolei inhibitory aromatazy obniżają stężenie estrogenów poprzez zahamowanie ich syntezy z androgennych prekursorów w wyniku blokowania aromatazy. Enzym ten jest kluczowym katalizatorem przekształcającym androgeny (takie jak testosteron i androstendion) w estrogeny (odpowiednio w estradiol i estron). Spośród inhibitorów aromatazy stosowanych w leczeniu raka piersi wyróżnia się letrozol, anastrozol oraz eksemestan [88, 120–125].



**Rycina 11.** Mechanizm działania SERM oraz AI stosowanych w leczeniu raka piersi (w modyfikacji własnej) [125].

Strategia leczenia hormonoterapią jest ściśle zależna od statusu menopauzalnego pacjentki. W przypadku kobiet w okresie przedmenopauzalnym standardowym leczeniem jest tamoksyfen podawany przez okres do 10 lat. Jednakże u kobiet z wysokim ryzykiem nawrotu zaleca się zastosowanie terapii skojarzonej złożonej z tamoksyfenu lub inhibitora aromatazy wraz z supresją jajników wywołaną usunięciem jajników lub analogami hormonu uwalniającego hormon luteinizujący/gonadotropinę. Z kolei u kobiet po menopauzie preferowaną metodą leczenia hormonalnego są inhibitory aromatazy ze względu na występującą po menopauzie involucję jajników. W wyniku wyciszenia produkcji estrogenu przez tkankę jajnika, głównym źródłem estrogenu staje się pozagruczołowa konwersja z androgenów za pośrednictwem enzymu aromatazy. Decyzja o leczeniu inhibitorem aromatazy dłużej niż 5 lat jest podejmowana indywidualnie w oparciu o stan kliniczny pacjentki i oczekiwaną korzyść w postaci zmniejszenia ryzyka kolejnych nowotworów piersi [88, 94, 120].

#### **2.6.5. Terapia celowana**

Rak piersi jest jednym z pierwszych nowotworów złośliwych, w leczeniu których z powodzeniem zastosowano terapie celowane. W ramach tej terapii wykorzystuje się leki zaprojektowane w taki sposób, aby mogły oddziaływać z określonymi białkami lub receptorami komórkowymi. W wyniku tych interakcji, ukierunkowane leki blokują konkretne szlaki sygnałowe w komórkach nowotworowych, uniemożliwiając im dalszy wzrost. Terapia celowana (biologiczna) może zostać wdrożona na każdym etapie terapii raka piersi- przed operacją jako terapia neoadjuwantowa lub po operacji jako terapia uzupełniająca. Terapia biologiczna jest szeroko powszechna u pacjentek z rakiem piersi HER2-dodatnim. Do głównych leków stosowanych w ramach terapii celowanej należą trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab deruxtekan, lapatynib oraz neratynib, przy czym za lek pierwszego rzutu uznaje się trastuzumab (Herceptynę), będący humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym specyficznym dla HER2. Ponadto stale badana jest skuteczność inhibitorów angiogenezy, takich jak rekombinowane humanizowane monoklonalne przeciwciało anty-VEGF (rhuMab VEGF) lub bewacyzumab. W przypadku luminalnego HER2 ujemnego raka piersi kobiety będące przed menopauzą częściej otrzymują ewerolimus (inhibitor m-TOR) z eksemestanem, natomiast kobiety po menopauzie często otrzymują jednocześnie palbocyklib lub rybocyklib

w skojarzeniu z terapią hormonalną. Dwa przedostatnie leki, obok abemacyklibu i ewerolimusu, można także stosować w leczeniu raka piersi HER2-ujemnego i estrogeno-dodatniego. Atezolizumab jest zatwierdzony w leczeniu potrójnie ujemnego raka piersi, natomiast denosumab w przypadku przerzutów do kości [88, 126].

#### **2.6.6. Immunoterapia**

Szczególnym rodzajem terapii celowanej jest immunoterapia. Immunoterapia nowotworów stanowi jeden z najważniejszych osiągnięć onkologii ostatnich lat. Profilowanie nowotworów piersi na poziomie molekularnym ujawniło ich immunoregulacyjny charakter, w związku z czym pacjentki z nowotworami bardziej immunogennymi mogą odnieść znaczącą korzyść z leczenia immunoterapeutycznego, co może istotnie polepszyć rokowanie. Urok immunoterapii polega na możliwości namierzania i eliminowania mikroprzerzutów w oparciu o specyficzną ekspresję białek nowotworowych, przy jednoczesnej minimalnej toksyczności. Innowacyjne leki immunoterapeutyczne eliminują komórki nowotworowe poprzez pobudzenie układu odpornościowego w wyniku proliferacji limfocytów T. W tym procesie wykorzystywany jest mechanizm oparty na obecności białek lub „punktów kontrolnych” wyrażanych na powierzchni komórek odpornościowych, które stanowią pewnego rodzaju przełącznik wyzwalania odpowiedzi immunologicznej. Komórki nowotworowe raka piersi zdolne są do manipulacji i modulacji punktów kontrolnych, co pozwala im na unikanie rozpoznawania i eliminowania przez elementy układu odpornościowego. Wobec tego, leki ukierunkowane na białka punktów kontrolnych pomagają przywrócić odpowiedź immunologiczną przeciwko nowotworowym komórkom raka piersi [127, 128].

Wzmocnienie układu odpornościowego w celu rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych poprzez spersonalizowaną immunoterapię staje się coraz bardziej intrygującą możliwością w leczeniu raka piersi. Amerykańska Agencja Żywności i Leków zatwierdziła dwa leki immunoterapeutyczne dopuszczone do leczenia raka piersi: pembrolizumab i dostarlimab. Pembrolizumab (Keytruda) oraz dostarlimab (Jemperli) są innowacyjnymi lekami ukierunkowanymi na receptor programowanej śmierci (PD-1, ang. *programmed death receptor 1*). PD-1 jest immunoreceptorem występującym na powierzchni limfocytów T, pełniącym funkcje negatywnego modulatora odpowiedzi immunologicznej, zapobiegającego atakowaniu innych komórek w organizmie. W wyniku blokowania PD-1

dochodzi więc do wzmacniania odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom raka piersi. Lek Jemperli znalazł zastosowanie w leczeniu zaawansowanego raka piersi z mutacją w genach systemu naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych (MMR, ang. *mismatch repair*) w przypadku braku dostępnych innych opcji leczenia. Z kolei lek Keytruda można stosować w skojarzeniu z chemioterapią w leczeniu nieoperacyjnego, miejscowo zaawansowanego lub przerzutowego raka piersi potrójnie ujemnego [127–129].

### 3. Zaburzenia procesu hemostazy w nowotworze piersi

Elementy układu hemostatycznego uczestniczą nie tylko w procesach fizjologicznych, ale również patofizjologicznych. Zaburzenie równowagi oraz rozregulowanie procesu hemostazy towarzyszy patogenezie wielu chorób, w tym chorobie nowotworowej. Badania prowadzone w ciągu ostatnich pięciu dekad wykazały dwukierunkową zależność pomiędzy występowaniem choroby nowotworowej a funkcjonowaniem układu hemostatycznego. Tkanki zmienione nowotworowo nie tylko powodują rozregulowanie układu hemostatycznego, ale również elementy układu hemostatycznego aktywnie uczestniczą w progresji choroby nowotworowej. Kluczowe mechanizmy sprzyjające nowotworzeniu, w szczególności wzrost guza pierwotnego, inwazja komórek nowotworowych, angiogeneza oraz tworzenie przerzutów, podlegają bezpośredniemu wpływowi elementów układu hemostatycznego. U pacjentów onkologicznych zaobserwowano, że różne stopnie ogólnoustrojowej aktywacji hemostatycznej odzwierciedlają różne fenotypy biologiczne nowotworu i korelują z jego agresywnością [52, 130, 131].

Pierwsze wzmianki na temat aktywacji układu hemostatycznego w przebiegu choroby nowotworowej można znaleźć w badaniach francuskiego klinicysty Armanda Trousseau'a, który w 1865 roku opisał przypadki występowania wędrującego zakrzepowego zapalenia u chorych na nowotwory. Kolejne dynamicznie rozwijające się badania potwierdziły, że ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowo-zatorowych u chorych na nowotwory złośliwe jest kilkakrotnie wyższe niż w populacji ogólnej [132, 133].

Od dłuższego czasu dużym zainteresowaniem wśród badaczy cieszy się kwestia wzajemnych interakcji zaburzeń układu hemostatycznego w przebiegu raka piersi. Analizy kolektywnych korelacji pomiędzy nowotworem piersi i procesem hemostazy opierają się na kluczowej roli aktywacji płytek, układu krzepnięcia i fibrynolizy. U kobiet chorych na raka piersi związek między nowotworem a układem hemostatycznym jest coraz częściej uznawany za ważny i niezależny czynnik regulujący progresję raka piersi. W rzeczywistości, elementy układu hemostatycznego, w tym płytki krwi, czynniki krzepnięcia i fibrynolityczne, mogą wpływać na wiele procesów pośredniczących w progresji raka piersi [131].

### 3.1. Rola płytek w przebiegu raka piersi

Od kilkudziesięciu lat u kobiet chorych na raka piersi obserwuje się zwiększoną aktywację płytek krwi oraz podwyższone ryzyko zakrzepicy. Wbrew pozorom, jeszcze do niedawna obserwacje te uznawano za zjawisko paranowotworowe. Obecnie, liczne badania eksperymentalne i kliniczne dostarczają niepodważalnych dowodów, że płytki krwi mogą odgrywać znaczącą rolę w progresji i promocji raka piersi. W świetle aktualnej wiedzy, trombocytoza obserwowana u kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi wiąże się z gorszym rokowaniem, co sugeruje potencjalną, bezpośrednią rolę płytek krwi w patogenezie tej choroby [131].

Udział płytek krwi w procesie transformacji nowotworowej ma ścisły związek z obecnością krążących komórek nowotworowych (CTCs, ang. *circulating tumor cells*). Krążące komórki nowotworowe definiowane są jako krążące we krwi obwodowej komórki nowotworowe, które zostały uwolnione z guza pierwotnego lub z miejsca jego przerzutów. Po inwazji naczyń krwionośnych krążące komórki nowotworowe mogą oddziaływać z różnymi komórkami naczyniowymi, takimi jak leukocyty, płytki krwi oraz komórki śródbłonna naczyniowego. Udokumentowano, że CTCs posiadają zdolność indukowania aktywacji i agregacji płytek krwi w mechanizmie zwanym agregacją płytek krwi indukowaną komórkami nowotworowymi (TCIPA, ang. *tumor cell-induced platelet aggregation*). Agregacja płytek indukowana komórkami nowotworowymi to proces, w którym komórki nowotworowe nabierają potencjału do ekspresji receptorów powierzchniowych oraz wydzielania kluczowych cząsteczek indukujących interakcje komórek nowotworowych z płytkami krwi, a następnie agregację płytek krwi. Krążące komórki nowotworowe syntetyzują i uwalniają szereg różnych czynników stymulujących aktywację płytek krwi, takich jak ADP, TXA<sub>2</sub>, trombinę, katepsyny, metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*), metaloproteinazy błonowej macierzy pozakomórkowej (MT-MMPs, ang. *membrane-type matrix metalloproteinases*), mucynę, czynnik tkankowy czy podoplaninę. Wydzielone przez komórki nowotworowe substancje w rezultacie aktywują receptory płytkowe: receptory purynergiczne P2Y<sub>12</sub>, receptory tromboksanu A<sub>2</sub>, receptory aktywowane proteazami PAR oraz receptory integryn, a następnie indukują wewnątrzpłytkową kaskadę sygnalizacyjną zapoczątkowującą agregację płytek krwi. Płytki krwi fizycznie oddziałują z komórkami nowotworowymi głównie poprzez wiązanie CLEC-2, selektyny P oraz integryn α6β1, GPIIb-IIIa

oraz GPIIb-IX-V występującymi na powierzchni płytek krwi odpowiednio z podoplaniną, glikoproteinowym ligandem 1 P-selektyny (PSGL-1, ang. *P-selectin glycoprotein ligand-1*), ADAM-9, fibrynogenem/ $\alpha v\beta 3$ /GPIIb-IIIa oraz vWF/GPIIb-IIIa wydzielanymi przez komórki nowotworowe. Co ciekawe, TCIPA może zostać zainicjowana również poprzez bezpośredni kontakt komórek nowotworowych z płytkami krwi bez udziału mediatorów. Utworzenie agregatów składających się z krążących komórek nowotworowych i płytek krwi prowadzi do powstania fizycznej bariery wokół komórek nowotworowych, co zapewnia komórkom nowotworowym ochronę przed działaniem sił ścinających przepływu krwi, a także wywiera efekt protekcyjny przed cytotoksycznym działaniem komórek układu immunologicznego, w tym komórek NK (NK, ang. *natural killers*). Mechanizmy te pozwalają na przeżycie komórek nowotworowych w układzie krążenia. Ponadto, aktywowane przez komórki nowotworowe płytki krwi uwalniają ze swoich ziarnistości różne czynniki, w tym proteazy serynowe, czynnik VIIa, czynnik Xa, płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, ang. *platelet-derived growth factor*), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), fibrynogen oraz trombospondynę, które przyczyniają się do zwiększenia przepuszczalność naczyń krwionośnych, wzrostu komórek nowotworowych oraz ich przeżycia i późniejszej migracji do innych narządów. Działania te znacząco zwiększają potencjał przerzutowy krążących komórek nowotworowych. Jednym z powodów, dla których TCIPA znajduje się w centrum uwagi aktualnych badań, jest badana możliwość wykorzystania leków przeciwplatek w terapii raka piersi. Ukierunkowanie procesu TCIPA na leki przeciwplatekowe może umożliwić odkrycie nowych sposobów oddziaływania terapeutycznego na środowisko nowotworowe i opracowanie nowych sposobów leczenia [22, 131, 134–138].

### **3.2. Rola układu krzepnięcia w przebiegu raka piersi**

Kliniczne obserwacje dostarczają licznych dowodów dotyczących występowania wzmożonej aktywności układu krzepnięcia u kobiet z rozpoznany rakiem piersi, co w ujęciu medycznym manifestuje się rozwojem żylną chorobą zakrzepowo-zatorową (VTE, ang. *venous thromboembolism*) i w konsekwencji krótszym przeżyciem u tych pacjentek [131]. W świetle najnowszych danych, pacjentki z rakiem piersi obarczone są 3-4 razy wyższym

ryzykiem wystąpienia VTE w porównaniu z kobietami zdrowymi (bez rozpoznania nowotworu) [139].

Patogeneza stanu prozakrzepowego w przebiegu raka piersi jest złożona, a na jej mechanizm składa się wiele czynników. Powszechnie uważa się, że w procesie tym biorą udział zarówno czynniki prokoagulacyjne wytwarzane przez komórki nowotworowe, jak i komórki gospodarza poprzez uruchomienie odpowiedzi zapalnej. Proces powstawania zakrzepów u chorych na raka piersi znacząco różni się od procesu zachodzącego w populacji nienowotworowej. Mechanizmy molekularne prowadzące do zwiększonej predyspozycji do zdarzeń zakrzepowo-zatorowych w przebiegu raka piersi odpowiedzialne są za wystąpienie stanu zakrzepicy związanej z rakiem (CAT, ang. *cancer-associated thrombosis*) [132, 140, 141].

Do głównych elementów układu krzepnięcia odgrywających istotną rolę w progresji raka piersi zalicza się czynnik tkankowy oraz trombinę [131]. W warunkach fizjologicznych czynnik tkankowy ulega konstytutywnej ekspresji w komórkach przydanki otaczających naczynia krwionośne. TF jest głównym fizjologicznym inicjatorem krzepnięcia zapobiegającym wynaczynieniu w przypadku uszkodzenia śródbłonna naczyniowego. W warunkach patologicznych TF ulega nieprawidłowej ekspresji na powierzchni komórek nowotworowych oraz komórek śródbłonna naczyniowego związanych ze środowiskiem nowotworowym. Od dawna znany jest fakt, że rak piersi jest stanem związanym ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia powikłań zakrzepowo-zatorowych. *Vice versa*, zaproponowano również, że nadmierna aktywacja krzepnięcia może wpływać na progresję tego nowotworu. Wykazano, że poza działaniem prozakrzepowym prowadzącym do wystąpienia zakrzepicy, nadekspresja TF w tkankach zmienionych nowotworowo stymuluje również angiogenezę, migrację, inwazję, oraz proliferację komórek nowotworowych [142, 143].

### **3.3. Rola czynnika tkankowego w promowaniu stanu prozakrzepowego**

Czynnik tkankowy ulega wszechobecnej nadekspresji w komórkach nowotworowych i jako główny inicjator krzepnięcia, TF jest uważany za najważniejszego promotora łączącego raka piersi z występowaniem stanu prozakrzepowego promującego rozwój żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych. Interesującym mechanizmem pozwalającym wyjaśnić kluczową rolę czynnika tkankowego w wyzwalaniu incydentów zakrzepowych w przebiegu raka piersi jest zjawisko uwalniania przez komórki nowotworowe submikronowych pęcherzyków błonowych



zwanych pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (EVs, ang. *extracellular vesicles*). Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe to pęcherzykowate struktury błony endocytarnej, które są uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez różne typy komórek, w tym komórki raka piersi. EVs zawierają na swojej powierzchni czynnik tkankowy oraz kilka innych receptorów powierzchniowych wyzwalających transdukcję molekularnych szlaków sygnalizacyjnych umożliwiającą oddziaływanie ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym. Ponadto, są funkcjonalnymi nośnikami zawierającymi mRNA, miRNA, DNA, białka oraz enzymy [143–145].

Komórki nowotworowe wykazujące nadekspresję TF w sposób konstytutywny uwalniają TF-dodatnie EVs (TF<sup>+</sup>EVs), co bezpośrednio aktywuje kaskadę krzepnięcia i sprzyja tworzeniu się skrzepów krwi. Wydzielony przez komórki nowotworowe czynnik tkankowy oddziałuje z plazmatycznymi czynnikami krzepnięcia i prowadzi do wytworzenia trombiny. Czynnik tkankowy obecny zarówno na powierzchni komórek nowotworowych, jak i wewnątrz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wiąże czynnik VII, prowadząc do aktywacji czynnika VII. Kompleks TF-VIIa aktywuje czynnik X i promuje interakcję czynnika Xa z czynnikiem Va, prowadząc do wytworzenia trombiny. Ponadto, fosfolipidy obecne na powierzchni TF<sup>+</sup>EVs zapewniają odpowiednią powierzchnię anionową umożliwiającą tworzenie kompleksów tenazy i protrombinazy, promując w ten sposób aktywację krzepnięcia. Nadmierna generacja trombiny skutkuje powstaniem mikrozakrzepów składających się z komórek przerzutowych otoczonych fibryną, które mogą przemieszczać się w naczyniach. W wyniku tego, konstytucyjna nadekspresja TF na powierzchni komórek złośliwych oraz aktywne uwalnianie TF<sup>+</sup>EVs może prowadzić do powstawania zarówno miejscowych, jak i ogólnoustrojowych stanów zatorowo-zakrzepowych [146–148].

### **3.3.1. Bezpośrednia rola czynnika tkankowego w progresji raka piersi**

Bezpośrednie działanie czynnika tkankowego promujące progresję raka piersi oparte jest na regulacji procesów komórek nowotworowych poprzez zmianę wytwarzania cząsteczek kontrolujących sygnalizację nowotworową. Czynnik tkankowy pochodzenia nowotworowego nie tylko prowadzi do generacji trombiny, przyczyniając się do wystąpienia fenotypu prozakrzepowego u kobiet z rakiem piersi, ale również aktywuje wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne poprzez wiązanie się z receptorami aktywowanymi proteazami (PAR).

Aktywacja tych receptorów ma istotne znaczenie w przebiegu procesów związanych z nowotworzeniem, takich jak wzrost i inwazja komórek nowotworowych, angiogeneza oraz hamowanie apoptozy. Warto podkreślić, że oprócz nadekspresji TF, komórki raka piersi wykazują zdolność do samoistnej, ektopowej syntezy czynnika VII, niezależniąc się od czynnika VII krążącego we krwi. Związanie kompleksu TF-VIIa z receptorem aktywowanym proteazami 2 (PAR-2, ang. *protease-activated receptor 2*) prowadzi do proteolitycznego rozszczepienia PAR-2. Aktywacja receptora PAR-2 skutkuje fosforylacją cytoplazmatycznej domeny TF poprzez fosfolipazę C i białkową kinazę C. Okazuje się, że domena cytoplazmatyczna TF reguluje interakcję i transdukcję sygnału kompleksu TF-VIIa-PAR-2. Swoistym procesem regulującym generowanie sygnału receptora PAR-2 jest stan fosforylacji domeny cytoplazmatycznej TF. W wyniku fosforylacji domeny cytoplazmatycznej TF zostaje zniesiona negatywna kontrola regulacyjna wywierana przez TF na receptor PAR-2 i włączona zostaje proliferacyjna sygnalizacja umożliwiającą aktywację trzech głównych członków rodziny kinaz aktywowanych mitogenami (MAPKs, ang. *mitogen-activated protein kinases*): p44/42, p38, oraz kinazy c-Jun N-terminalnej (JNK, ang. *c-Jun N-terminal kinase*). Dodatkowo aktywowany zostaje szlak PI3K/Akt/mTOR oraz Rac1. Całkowita aktywacja tych szlaków prowadzi do transkrypcji genów i biosyntezy białek, takich jak VEGF, interleukina 8 (IL-8, ang. *interleukin 8*), czynnik stymulujący kolonie 1 (CSF-1, ang. *colony stimulating factor 1*), u-PA, PAI-1, Egr-1, CXCL1, Cyr61 oraz surwiwina. Białka te sprawują funkcję czynników wzrostu, induktorów angiogenezy, inhibitorów apoptozy albo białek sygnalizacyjnych macierzy zewnątrzkomórkowej, które mają kluczowe znaczenie dla progresji nowotworowej poprzez zdolność do stymulacji rozwoju nowych naczyń krwionośnych oraz regulacji funkcji komórkowych, takich jak adhezja, proliferacja i migracja komórek, które w przebiegu raka piersi są niezbędne dla procesu angiogenezy i powstawania przerzutów [131, 149–151].

Chociaż fizjologiczne znaczenie aktywacji szlaku MAPK indukowanego TF-VIIa w procesie angiogenezy nie jest w pełni poznane, rodzinę kinaz MAPK w coraz większym stopniu wiąże się z proliferacją komórek, co sugeruje, że kompleks TF-VIIa może przyczyniać się do procesu angiogenezy poprzez stymulację podziału ECs. Zdolność mitogenna TF-VIIa pozostaje jednak dyskusyjna, a bardziej prawdopodobny mechanizm polega na wytwarzaniu białek stymulujących angiogenezę. Liczne badania z wykorzystaniem komórek raka piersi wskazują na dodatnią korelację pomiędzy stężeniem TF oraz VEGF, który jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za proces angiogenezy nowotworowej. Okazuje się, że TF

indukuje pobudzenie syntezy VEGF poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego. Ponadto, stwierdzono kolokalizację TF i VEGF oraz niezależny związek wysokiej ekspresji TF, VEGF i gęstości mikronaczyń z progresją raka piersi. Obserwacje te pozwalają wywnioskować, że TF może bezpośrednio modyfikować proangiogenne właściwości VEGF [149, 151].

Sposób, w jaki czynnik tkankowy przyczynia się do powstawania przerzutów w przebiegu raka piersi oraz molekularny mechanizm tego procesu nie został całkowicie poznany. Jednakże wiadomo, że kompleks TF-VIIa może odgrywać bezpośrednią rolę w procesie przerzutowania lub przy udziale indukowanych przez TF aktywnych czynników krzepnięcia. Istnieją jednak niepodważalne dowody potwierdzające, że sygnalizacja TF-VIIa stymuluje ruchliwość komórek nowotworowych. W wyniku aktywacji szlaku Rac1 przez kompleks TF-VIIa zostaje uruchomiona ścieżka sygnałowa modyfikująca cytoszkielet aktynowy, prowadząc do formowania lamellipodii niezbędnych do ruchu i migracji komórek nowotworowych. Dodatkowo, za pośrednictwem aktywacji receptora PAR-2 zostaje rekrutowana również  $\beta$ -arestyna, będąca kompleksem „rusztowań białkowych”. Rekrutacja  $\beta$ -arestyny w kierunku lokalizacji kinaz związanych z sygnałem zewnątrzkomórkowym promuje ruchliwość komórek nowotworowych, co w konsekwencji sprzyja migracji i inwazji, a dodatkowo nasila rozwój angiogenezy. Ponadto, prace eksperymentalne wykazały, że zewnątrzkomórkowa ligacja cząsteczki TF skutkuje specyficzną interakcją domeny cytoplazmatycznej z białkiem wiążącym aktynę 280 (ABP-280, *ang. actin-binding protein 280*), co wspomaga adhezję i migrację komórek nowotworowych [149, 152].

Badania z wykorzystaniem linii komórkowej raka piersi MCF-7 wykazały, że działanie antyapoptotyczne indukowane sygnalizacją kompleksu TF-VIIa oparte jest na fosforylacji zarówno p44/42 MAPK, jak i kinazy białkowej B/Akt (PKB, *ang. protein kinase B*) oraz częściowo może wynikać ze wzrostu stężenia antyapoptotycznego białka surwiwiny [149].

### **3.3.2. Pośrednia rola czynnika tkankowego w progresji raka piersi**

Pośredni udział czynnika tkankowego w progresji raka piersi jest ściśle związany z procesem krzepnięcia i generacją trombiny. TF w kompleksie z czynnikiem VIIa prowadzi do aktywacji czynnika Xa odpowiedzialnego za proteolityczną konwersję protrombiny do trombiny, która swoiście oddziałuje z receptorem aktywowanym przez proteazy 1 (PAR-1, *ang. protease-activated receptors 1*). W kilku modelach eksperymentalnych przeprowadzonych na

modelach zwierzęcych w warunkach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że trombina wzmacnia adhezję komórek nowotworowych do białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zwiększa liczbę przerzutów. W ustalonych liniach komórek nowotworowych poziomy ekspresji PAR-1 koreluje bezpośrednio ze stopniem inwazyjności nowotworu piersi. Przeprowadzone badania potwierdzają, że wysoce inwazyjna linia komórkowa ludzkiego raka piersi MDA-MB-231 wykazuje bardzo wysoką ekspresję receptora PAR-1, z kolei mało inwazyjna linia komórkowa ludzkiego raka piersi MCF-7 wyraża jedynie śladowe ilości PAR-1. Obserwacje te są zgodne z ustaleniami wskazującymi, że wysoki poziom mRNA PAR-1 występuje w naciekającym raku przewodowym, podczas gdy bardzo niskie ilości mRNA PAR-1 obserwuje się w prawidłowym i przednowotworowym atypowym rozroście wewnątrzprzewodowym. Pomimo tych obserwacji, mechanizmy molekularne leżące u podstaw sygnalizacji trombina-PAR-1 w progresji raka piersi nie zostały w pełni poznane. Najprawdopodobniej, trombina pośrednio indukuje reorganizację komórkową poprzez aktywację PAR-1 i transaktywację receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*). Co więcej, oddziaływanie trombiny wraz z receptorem PAR-1 wywiera mitogeny wpływ na komórki endotelialne. Ponadto, aktywowany receptor PAR-1 bierze udział w migracji i inwazyjności komórek nowotworowych raka piersi poprzez szlak PI3K [131, 151, 153, 154].

Dodatkowo, w wyniku aktywacji receptora PAR-1 przez trombinę zostaje zainicjowana ekspresja onkogenu związanego ze wzrostem alfa (GRO- $\alpha$ , ang. *growth-related oncogene-alpha*), a następnie transkrypcja i zwiększona synteza MMPs, VEGF, angiopoetyny-2 (ANG-2, ang. *angiopoietin-2*), CD31 oraz receptorów KDR/CXCR-2 obecnych na powierzchni komórek endotelialnych, przyczyniając się tym samym do wzrostu guza, angiogenezy oraz metastazy [131].

Inicjowana przez TF generacja trombiny jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za zależną od krzepnięcia indukcję angiogenezy. Trombina przyczynia się do powstawania i odkładania się złogów usieciowanej fibryny, które zapewniają tymczasową macierz proangiogenną oraz stanowią fizyczne rusztowanie dla nowotworowych nowopowstałych naczyń krwionośnych [149, 151].

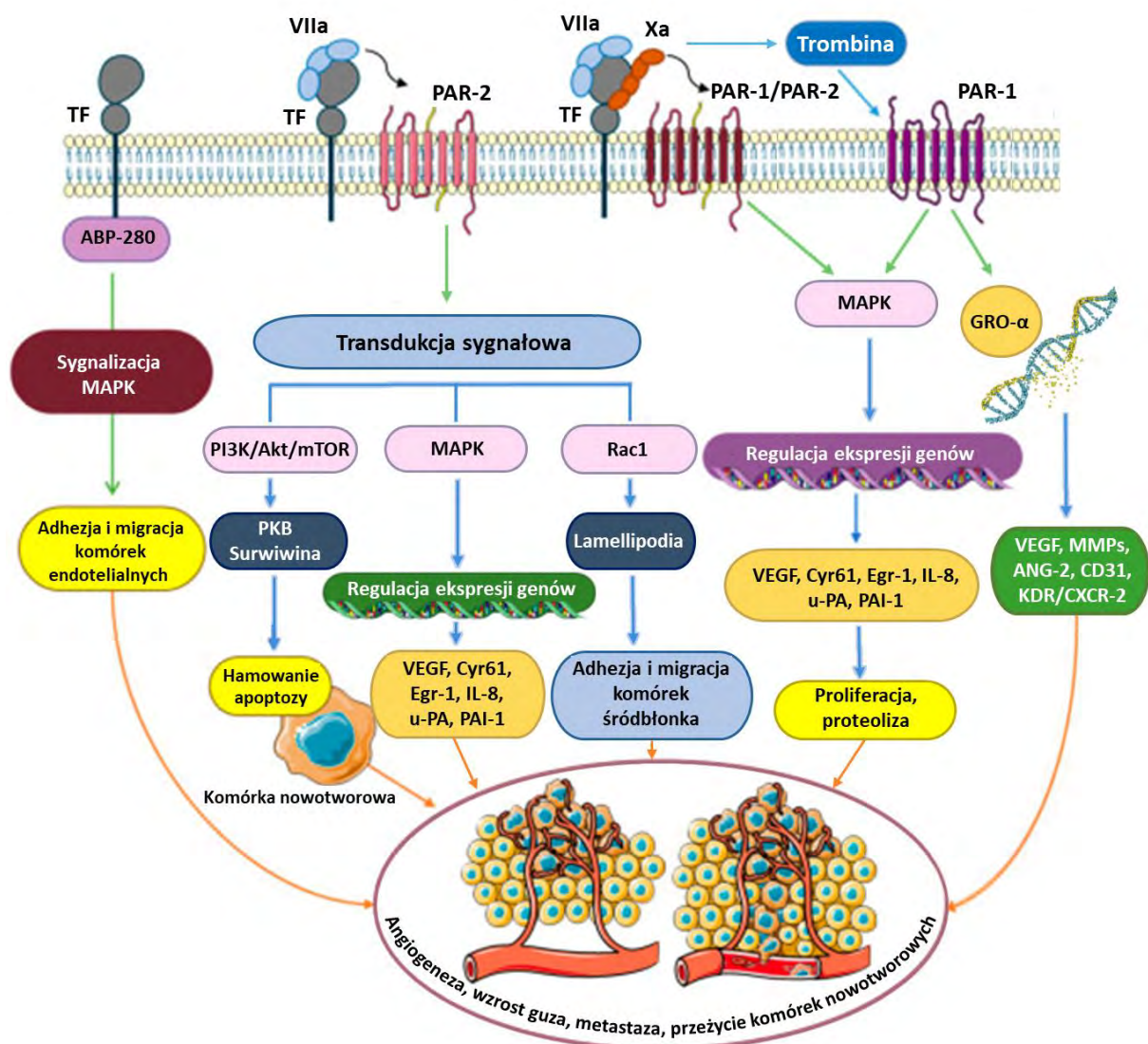
Liczne badania wykazały, że aktywacja krzepnięcia w przebiegu raka piersi może również pośrednio wspierać angiogenezę poprzez uwalnianie czynników proangiogennych z ziarnistości  $\alpha$  aktywowanych płytek krwi, w tym VEGF, zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF, ang. *basic fibroblast growth factor*) oraz PDGF oraz uruchamianie

proangiogennych szlaków sygnalizacyjnych zależnych od aktywowanego czynnika Xa. Efektywna transdukcja sygnału przez kompleks TF-VIIa-Xa odbywa się za pośrednictwem receptora PAR-1 oraz PAR-2, co w konsekwencji prowadzi do indukcji szlaku MAPK i mTOR oraz aktywacji kinazy białkowej B [149, 150].

Należy podkreślić, że progresja raka piersi indukowana elementami krzepnięcia zależna jest głównie od tworzenia i sygnalizacji kompleksu TF-VIIa-PAR-2. Jednakże sygnalizacja za pośrednictwem PAR-1 może dodatkowo zwiększać inwazyjność komórek raka piersi. Zatem funkcja sygnalizacji PAR-1 i PAR-2 związana z progresją raka piersi może się różnić w zależności od mikrośrodowiska komórkowego i względnych poziomów ekspresji tych receptorów [150].

### **3.4. Rola inhibitora szlaku czynnika tkankowego w przebiegu raka piersi**

W tkankach raka piersi obserwuje się obniżoną ekspresję TFPI. Niska ekspresja TFPI jest istotnie związana z wielkością guza, stopniem histologicznym, stopniem zaawansowania klinicznego oraz występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych. Udowodniono, że obniżone stężenie TFPI skorelowane jest ze złym rokowaniem, co wskazuje na wysoki potencjał TFPI jako biomarkera prognostycznego w przypadku raka piersi. Co więcej, funkcjonalne testy *in vitro* wykazały, że nadekspresja TFPI hamuje żywotność, proliferację, migrację i inwazję komórek nowotworowych, wytyczając w ten sposób nowy obiecujący cel terapeutyczny. Jak pokazują wyniki badań, wysoka ekspresja TFPI pozwala na znaczne wydłużenie czasu przeżycia wolnego od choroby. W odniesieniu do stopnia zaawansowania nowotworu, ekspresja TFPI w łagodnym nowotworze piersi jest znacznie wyższa niż w przypadku nowotworu złośliwego piersi, a zaawansowany zasięg raka piersi jest skorelowany z istotnie niższą ekspresją TFPI. Pacjentki z niższą ekspresją TFPI są narażone na 3-krotnie wyższe ryzyko nawrotu raka piersi i z tego względu powinny zostać zakwalifikowane do otrzymania skuteczniejszej terapii systemowej w celu ograniczenia ryzyka nawrotu nowotworu. Wyniki te łącznie wskazują, że TFPI zachowuje się jako supresor nowotworu w rozwoju raka piersi i może zostać uznany za nowy obiecujący biomarker prognostyczny przewidujący przebieg choroby nowotworowej oraz skuteczny czynniki predykcyjny leczenia raka piersi, co wyraźnie zasługuje na dalsze badania w celu możliwego przełożenia na praktykę kliniczną [155, 156].



**Rycina 12.** Molekularne mechanizmy działania elementów krzepnięcia w progresji raka piersi (w modyfikacji własnej) [131, 149, 157].

### 3.5. Rola układu fibrynolizy w progresji raka piersi

Nadmierna aktywacja układu fibrynolizy odkrywa istotną rolę w patogenezie raka piersi i stanowi integralny mechanizm w rozwoju tego nowotworu. Badania nad rolą układu fibrynolizy w progresji raka piersi są wciąż przedmiotem intensywnego zainteresowania, choć istnieje już pewne zrozumienie mechanizmów, przez które elementy układu fibrynolitycznego mogą być zaangażowane w rozwój nowotworu. Charakterystyczną obserwowaną cechą w przebiegu choroby nowotworowej jest osłabienie procesów fibrynolizy wewnątrznaczyniowej z jednoczesną wzmożoną aktywnością proteolizy pozanaczyniowej,

związaną z progresją nowotworu. Liczne badania podkreślają kluczowe znaczenie elementów fibrynolitycznych w procesie angiogenezy, rozwoju guza i przerzutowaniu komórek nowotworowych. Ponadto, układ fibrynolityczny sprzyja nowotworzeniu poprzez hamowanie apoptozy, proliferację komórek nowotworowych oraz degradację macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*). Do elementów układu fibrynolizy, które odgrywają ważną rolę w progresji raka piersi, zalicza się plazminogen, plazminę t-PA, u-PA, receptor aktywatora plazminogen typu urokinazy (uPAR, ang. *urokinase-type plasminogen activator receptor*) oraz PAI-1. Wszystkie wyżej wymienione białka układu fibrynolitycznego ulegają wybitnej ekspresji w komórkach mikrośrodowiska nowotworowego. Niemniej jednak, główny udział w progresji raka piersi przypisuje się przede wszystkim osi u-PA/uPAR/PAI-1, natomiast znaczenie pozostałych elementów fibrynolizy w procesie nowotworzenia jest znacznie rzadziej dyskutowane [131, 158–162].

Pronowotworowy charakter układu u-PA/uPAR wynika ze zdolności tego kompleksu do indukowania nasilonej lokalnej proteolizy, stymulacji angiogenezy oraz uruchomienia szlaku sygnałowego, przesuwając w ten sposób fenotyp nowotworu w kierunku fenotypu o większym stopniu inwazyjności. Udział u-PA w progresji choroby nowotworowej związany jest szczególnie z procesem przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, co w konsekwencji stymuluje proliferację i migrację oraz moduluje adhezję komórek nowotworowych. Wyniki licznych obserwacji potwierdzają, że oddziaływania z macierzą pozakomórkową odgrywają istotną rolę w procesach inicjujących migrację, inwazję oraz angiogenezę w przebiegu raka piersi. ECM będąca strukturą oddzielającą mięsz narządów od leżącego pod nimi zrębu, stanowi fizyczną barierę zewnątrzkomórkową wobec komórek nowotworowych. Podczas inwazji nowotworowej komórki złośliwe kilkakrotnie penetrują i przebudowują macierz zewnątrzkomórkową. Podczas powstawania przerzutów odległych, atakujące komórki muszą przejść przez błonę podstawną ECM co najmniej 3-krotnie, początkowo podczas rozprzestrzeniania się ogniska pierwotnego, a następnie podczas intra- i ekstrawazacji z krwiobiegu. W przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej biorą udział różnego typu hydrolazy, w tym metaloproteinazy, katepsyny, heparnazy oraz kompleks u-PA/plazmina. Niemniej jednak, u-PA posiada ograniczoną specyficzność w stosunku do składników ECM, i jak dotychczas wykazano, u-PA bezpośrednio degraduje jedynie fibronektynę. Natomiast u-PA uczestniczy również pośrednio w degradacji ECM. W wyniku wiązania u-PA ze swoistym receptorem uPAR dochodzi do konwersji plazminogenu do plazminy, co z kolei inicjuje

kaskadę proteolitycznej degradującej składniki macierzy pozakomórkowej. W przeciwieństwie do u-PA, plazmina jest zdolna do bezpośredniego trawienia większości białek niekolagenowych, w tym fibryny, lamininy, fibronektyny, oraz perlekanu. Ponadto, plazmina umożliwia mobilizację metaloproteinaz, które podobnie jak plazmina, posiadają szeroką specyficzność substratową i zdolność do rozkładania proteoglikanów, lamininy, fibronektyny oraz kolagenu niefibrylarnego, co znacznie zwiększa zakres proteolitycznego działania plazminy. Ostatecznie, następstwem aktywacji tych procesów jest proteolityczna degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej, sprzyjająca w ten sposób migracji i inwazji komórek nowotworowych oraz inicjacji angiogenezy. Liczne badania wykazały, że funkcjonalność układu u-PA/uPAR nie ogranicza się tylko do proteolizy. Istotny jest fakt, że komórki raka piersi wykazujące ekspresję u-PA są zdolne do wytwarzania plazminy *in situ*, która lokalnie zwiększa obciążenie nowotworem i pogarsza rokowanie pacjentek. Powstała plazmina stymuluje wzrost i proliferację komórek nowotworowych poprzez aktywację specyficznych czynników wzrostu stymulujących proliferację, w tym VEGF, PDGF, czynnika wzrostu fibroblastów (FGF, ang. *fibroblast growth factor*), insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1, ang. *insulin-like growth factor 1*) oraz czynnika wzrostu hepatocytów (HGF, ang. *hepatocyte growth factor*). Czynniki FGF2 i VEGF są kluczowymi stymulatorami wzrostu komórek śródbłonna naczyniowego, przez co odgrywają bezpośrednią rolę w angiogenezie, natomiast IGF-1 oraz HGF stymulują wzrost komórek nabłonka. Dodatkowo, u-PA wraz ze swoim receptorem u-PAR tworzy kompleks z witronektyną i integrzynami, wzmacniając adhezję komórek i sprzyjając przerzutom komórek nowotworowych. Kompleks utworzony przez uPAR z integrzyną  $\alpha_v\beta_3$  wiąże się z EGFR i uruchamia szlak sygnałowy kaskady MAPK przekazujący sygnały mitogenne poprzez kinazy RAF-MEK-ERK, które zaangażowane są w proces proliferacji komórek nowotworowych oraz przerzutowanie. Udowodniono również, że podwyższona ekspresja uPAR aktywuje szlaki sygnałowe Akt i Rac1, prowadząc do promocji przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT, ang. *epithelial-mesenchymal transition*), w wyniku którego spolaryzowane komórki nabłonkowe przekształcają się w wysoce inwazyjne komórki mezenchymalne o zwiększonych zdolnościach migracyjnych, zwiększonej oporności na apoptozę, a także zwiększonych możliwościach wytwarzania białek ECM [159, 163–166].

Teoretycznie można by przypuszczać, że ze względu na zdolność PAI-1 do hamowania aktywności u-PA, nadekspresja PAI-1 będzie wykazywała działanie przeciwnowotworowe zapobiegające progresji raka piersi. Paradoksalnie, wiele badań klinicznych wykazało, że PAI-1



aktywnie uczestniczy w różnych stadiach rozwoju choroby nowotworowej. Paradoks ten może częściowo wynikać ze zdolności PAI-1 do ograniczania aktywności proteolitycznej u-PA, co zachowuje w ten sposób integralność struktury ECM i uniemożliwia migrację komórek nowotworowych. Niemniej jednak, podobnie jak u-PA, nadekspresja PAI-1 sprzyja progresji choroby nowotworowej poprzez hamowanie apoptozy oraz stymulację migracji, inwazji i angiogenezy nowotworowej. Zaproponowano kilka mechanizmów, które na poziomie komórko-molekularnym wyjaśniają udział PAI-1 w nowotworzeniu. Podczas oddziaływania u-PA ze swoim receptorem uPAR na powierzchni komórki nowotworowej, dochodzi do zmian konformacyjnych umożliwiających utworzenie stabilnych kompleksów z integrzynami oraz składnikami ECM, zwłaszcza z witronektyną. Poprzez wiązanie witronektyny utworzony kompleks nabiera zdolności promujących adhezję komórek. W obecności PAI-1 dochodzi do dodatkowej interakcji. Wiązanie PAI-1 z kompleksem u-PA/uPAR inaktywuje u-PA i umożliwia formowanie kompleksu PAI-1/u-PA/uPAR, który następnie zostaje internalizowany z powierzchni komórki. W wyniku endocytozy u-PA i PAI-1 ulegają degradacji, natomiast uPAR wraca do błony komórkowej, eksponując receptor w innym miejscu powierzchni komórki, co umożliwia ponowne związanie komórki z witronektyną, regulując w ten sposób nie tylko ruchliwość komórki, ale także kierunek migracji. W wyniku internalizacji kompleksu u-PA/uPAR/PAI-1, wewnątrzkomórkowy PAI-1 inaktywuje kaspazę-3, co prowadzi do zahamowania apoptozy. PAI-1 może również promować przeżycie komórek nowotworowych poprzez zwiększenie ekspresji antyapoptotycznych regulatorów c-jun/ERK, Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> oraz obniżenie poziomu białek proapoptotycznych Bcl-X<sub>s</sub> oraz Bax. Innym potencjalnym mechanizmem warunkującym przeżycie komórek nowotworowych jest hamowanie przez PAI-1 szlaku apoptozy FAS/FASL. PAI-1 jest również istotnym stymulatorem angiogenezy poprzez promowanie migracji, przeżycia i proliferacji komórek śródbłonna naczyniowego. Proangiogeny potencjał PAI-1 wynika przede wszystkim z jego właściwości hamowania aktywności proteaz oraz zdolności do wiązania witronektyny. Poprzez wysokie powinowactwo PAI-1 do domeny somatomedyny B (IGF-1) na N-końcu witronektyny, PAI-1 zakłóca wiązanie ECs z witronektyną. W wyniku tego procesu PAI-1 promuje odłączenie komórek endotelialnych od witronektyny, co z kolei skutkuje ich migracją w obecności integryny  $\alpha 5\beta 1$  w kierunku bogatego w fibronektynę, ale mniej unaczynionego zrębu nowotworowego. Dzięki swojej aktywności antyfibrynolitycznej, PAI-1 zwiększa odkładanie się fibryny w obrębie tkanki nowotworowej, co sprzyja organizacji komórek śródbłonna naczyniowego i uwalnianiu białek

angiogennych, takich jak interleukina IL-8. Dodatkowo, jako inhibitor aktywacji plazminogenu, PAI-1 chroni ECs przed zewnętrzną apoptozą zależną od FasL. Niemniej jednak, rola PAI-1 w procesie angiogenezy do tej pory pozostaje kontrowersyjna. Udokumentowano, że angiogenne właściwości PAI-1 są ściśle zależne od jego stężenia oraz stadium rozwoju nowotworu. PAI-1 wykazuje działanie promujące angiogenezę w stężeniach fizjologicznych (nanomolowych), natomiast działanie hamujące w stężeniach farmakologicznych (mikromolarnych). Wiele eksperymentów *in vitro* wykazało, że PAI-1 sprzyja również migracji komórek nowotworowych. Podobnie jak w przypadku komórek śródbłonna naczyniowego, PAI-1 zapobiega adhezji komórek nowotworowych do witronektyny i równocześnie stymuluje ich migrację w kierunku innych substratów ECM, takich jak fibronektyna. Jednocześnie w wyniku hamowania u-PA związanego z uPAR, PAI-1 ogranicza okołokomórkową degradację białek ECM niezbędnych do adhezji i migracji komórek. PAI-1 odgrywa zatem rolę modulatora migracji komórek, zarówno poprzez promowanie oddzielania się komórek od niektórych białek ECM, takich jak witronektyna, jak i zapobieganie nadmiernej okołokomórkowej degradacji ECM. Niektóre badania wykazały, że PAI-1 posiada także działanie stymulujące wzrost prowadzące do przejścia cyklu komórkowego z fazy G1 do fazy S w wyniku zwiększenia ekspresji cykliny D3/cdk4/6 w komórkach nowotworowych. Jednakże kolejne badania przeprowadzone na liniach komórkowych ludzkiego raka piersi odnotowały hamującą funkcję PAI-1 w procesie proliferacji zależnej i niezależnej od zakotwiczenia w macierzy zewnątrzkomórkowej. Kwestia, czy PAI-1 bezpośrednio wpływa na cykl komórkowy nowotworu pozostaje jednak kontrowersyjna. Pomimo tego, dobrze udokumentowane jest, że PAI-1 wywiera pośredni wpływ modulujący na wzrost komórek nowotworowych. Hamując fibrylizę, PAI-1 utrzymuje aktywność trombiny, która oddziałuje z receptorami PAR obecnymi na powierzchni komórek nowotworowych, co wzmaga ich proliferację. Wręcz przeciwnie, w mechanizmie blokowania interakcji u-PA/uPAR z EGFR, PAI-1 hamuje wzrost komórek zależny od naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*). Podobnie, w wyniku hamowania aktywności kompleksu u-PA/uPAR, PAI-1 może również stymulować stan uśpienia komórek nowotworowych. W liniach komórkowych raka piersi stosunek aktywności ERK/p38 określa, czy komórki *in vivo* będą proliferować, czy przejdą w stan uśpienia. Wysoki stosunek ERK/p38 sprzyja wzrostowi nowotworu, podczas gdy niski stosunek ERK/p38 indukuje stan uśpienia. Wzmocniona aktywność u-PA/uPAR stymuluje integrynę  $\alpha 5\beta 1$  i aktywuje ERK1/2, co prowadzi do znacznego zwiększenia stosunku ERK/p38.

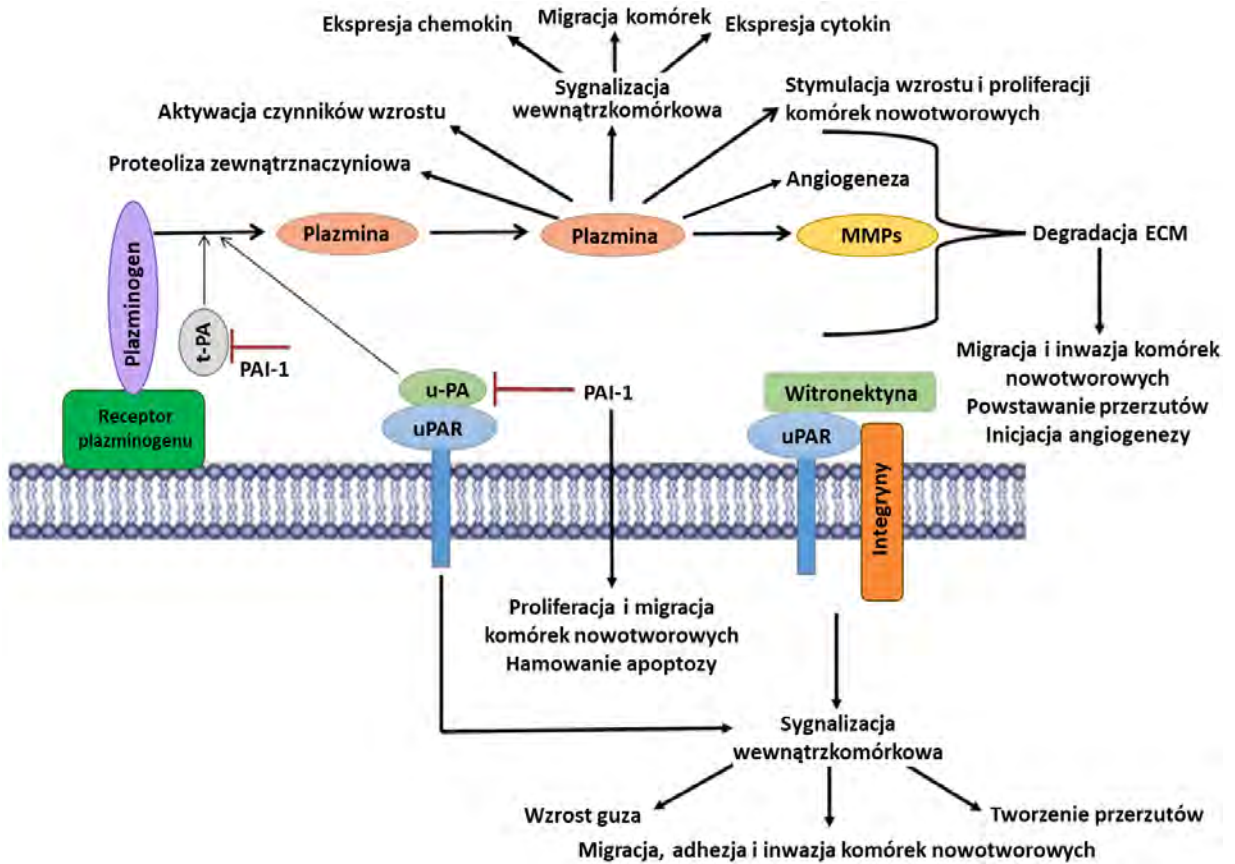
Natomiast hamowanie aktywności u-PA/uPAR przez PAI-1 odwraca ten stosunek, hamując w ten sposób wzrost i sprzyjając uśpieniu komórek nowotworowych. Całokształt powyższych mechanizmów potwierdza paradoksalny udział PAI-1 w nowotworzeniu, utrudniający jednoznaczne określenie, czy PAI-1 spełnia rolę bardziej pro- czy przeciwnowotworową. PAI-1 jest zatem bardziej modulatorem proliferacji, migracji i angiogenezy komórek nowotworowych, wykazującym złożone działania poprzez interakcje z u-PA, uPAR oraz integrzynami i białkami macierzy zewnątrzkomórkowej [164, 167–172].

Z racji tego, że u-PA jest zaangażowany w proteolizę pozanacyniową, to jego rola w rozwoju inwazji komórek nowotworowych wydaje się być oczywista i dobrze wyjaśniona. Natomiast w przeciwieństwie do u-PA, t-PA pełni głównie funkcję aktywatora fibrynolizy ograniczonej do obszaru wewnątrznaczyniowego, dlatego rola t-PA w rozwoju raka piersi nie została jeszcze całkowicie poznana. Co więcej, doniesienia dotyczące udziału t-PA w progresji choroby nowotworowej są zupełnie sprzeczne. Wydaje się, że nadekspresja t-PA u kobiet dotkniętych rakiem piersi może bezpośrednio wynikać z nasilonego wytwarzania i wydzielania t-PA przez komórki nowotworowe lub ze wzmożonego uwalniania tego aktywatora przez komórki endotelialne nowopowstałych naczyń nowotworowych. Oprócz swojej fizjologicznej roli trombolitycznej, t-PA jest uważany za ważny czynnik stymulujący procesy związane z transformacją nowotworową, takie jak proliferacja, migracja i inwazja komórek nowotworowych. W ujęciu molekularnym, t-PA może indukować proliferację w wielu różnych typach komórek, w tym komórkach raka piersi. Przypuszcza się, że mitogenne działanie t-PA jest niezależne od jego aktywności katalitycznej i jest ściśle związane z aktywacją kinaz Src i ERK1/2. Ponadto wykazano, że identycznie jak u-PA, t-PA również przyczynia się do degradacji błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez inicjację transformacji plazminogenu do plazminy. Proces ten prowadzi do przebudowy struktury tkanek, co wyzwała uruchomienie proangiogenego fenotyp umożliwiającego inwazję migrację i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych, wpływając na wzrost zarówno komórek nowotworowych, jak i nacyniowych. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia, że poza swoją rolą proteolityczną, t-PA również bezpośrednio aktywuje wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe w sposób niekatalityczny. Obserwacje te doprowadziły do klasyfikacji tej proteazy jako cytokiny. t-PA występuje na powierzchni komórek śródbłonna nacyniowego, co wskazuje, że może brać udział w neoangiogenezie. Dodatkowo, t-PA wykazuje zdolność do bezpośredniej indukcji ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna nacyniowego poprzez

transaktywację p38 przez układ ERK. Co więcej, t-PA jest w istotny sposób związany z migracją komórek nowotworowych ze względu na aktywację receptorów błonowych, takich jak, aneksyna-2, EGFR oraz białko 1 związane z receptorem lipoproteiny niskiej gęstości (LRP1, ang. *low density lipoprotein receptor-related protein 1*). Cytokinowa funkcja t-PA dodatkowo uruchamia szlaki sygnałowe, takie jak NFκB, MEK-ERK i p-38 MAPK, przyczyniając się do aktywacji szeregu procesów związanych z nowotworzeniem. Badania z wykorzystaniem linii komórkowych MCF-7 i T47 luminalnego raka piersi przeprowadzone przez Qiu i wsp. udokumentowały, że t-PA bierze udział w zależnym od CD44 wzroście lamellipodiów niezbędnych do migracji i inwazji komórek nowotworowych. Wręcz przeciwnie do powyższych postulatów, niektóre badania nad nowotworem piersi sugerują, że komórki raka gruczołu piersiowego o wysokim stężeniu t-PA determinują zwykle korzystne rokowanie w porównaniu z komórkami z niskim lub niewykrywalnym stężeniem t-PA, co sugeruje złożoną rolę układu aktywacji plazminogenu w przebiegu raka piersi. Dodatkowo, na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykorzystujących modele komórkowe raka piersi, zaproponowano, że t-PA jest białkiem indukowanym przez estrogeny, co zostało potwierdzone w badaniach klinicznych wykazujących istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem t-PA a ekspresją receptorów estrogenowych i progesteronowych w komórkach raka piersi [173–180].

Zgodnie z najnowszą wiedzą, u-PA i PAI-1 to pierwsze biomarkery hemostatyczne, których użyteczność prognostyczna i predykcyjna została powszechnie zweryfikowana oraz klinicznie zwalidowana. Pomiar ekspresji u-PA i PAI-1 jest obecnie powszechnie zalecany w celu określenia rokowania i podejmowania decyzji dotyczących leczenia. Zgodnie z przyczynową rolą u-PA i PAI-1 zwiększona ekspresja u-PA i PAI-1 w tkance nowotworowej piersi stanowi silny i niezależny czynnik prognostyczny złego rokowania. Pacjentki z pierwotnym rakiem piersi, a w szczególności pacjentki z niezajętymi węzłami chłonnyymi i wysoką ekspresją antygenów u-PA i PAI-1 w tkance nowotworowej mają mniejsze prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od choroby i przeżycia całkowitego niż pacjentki z niską ekspresją tych biomarkerów. Z kolei wyniki badań nad rolą t-PA w przebiegu raka piersi potwierdziły ścisłą zależność pomiędzy obniżoną ekspresją t-PA w komórkach nowotworowych a występowaniem guzów o dużych rozmiarach, słabym różnicowaniem histologicznym, aneuploidią oraz z dużą frakcją komórek w fazie S. Ponadto, niska ekspresja

t-PA jest istotnie i niezależnie powiązana z krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby i przeżycia całkowitego u pacjentek z niezajętymi węzłami chłonnymi, co klinicznie manifestuje się wyższym prawdopodobieństwem nawrotu choroby i przedwczesnej śmierci [180–184].



**Rycina 13.** Kluczowe mechanizmy elementów fibrylizy w progresji raka piersi (w modyfikacji własnej) [185].

### 3.6. Powikłania leczenia przeciwnowotworowego

Pomimo skuteczności współczesnych terapii przeciwnowotworowych, istnieją znaczące potencjalne skutki uboczne związane z leczeniem onkologicznym. Liczne badania dostarczają niepodważalnych dowodów na to, że nieprawidłowy przebieg hemostazy w chorobie nowotworowej może mieć nie tylko charakter pierwotny wynikający z samej biologii guza, ale dodatkowo może się nasilać pod wpływem różnych form leczenia. Szczególną obawę budzi fakt, że wielokrotne terapie przeciwnowotworowe wiążą się ze zwiększonym ryzykiem zakrzepicy. Wykazano, że kilka cytotoksycznych środków chemioterapeutycznych,

a także hormonoterapia, radioterapia i terapia celowana istotnie przyczyniają się do wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych w zakresie procesu hemostazy.

Leczenie raka, w tym chemioterapia, terapia hormonalna, terapia celowana i radioterapia, zostały zidentyfikowane jako ważny niezależny czynnik ryzyka VTE u pacjentek chorych na raka. Leki przeciwnowotworowe mogą wywoływać działanie trombogeniczne poprzez wiele różnych mechanizmów: (1) uwalnianie prokoagulantów i cytokin prozapalnych z uszkodzonych komórek nowotworowych; (2) bezpośrednią toksyczność leku na śródbłonek naczyń; (3) bezpośrednią indukcję ekspresji TF w monocytach lub komórkach nowotworowych; (4) zmniejszenie stężeń fizjologicznych antykoagulantów; oraz (5) aktywację i agregację płytek krwi. Bezpośrednie uszkodzenie komórek śródbłonka naczyniowego przez środki przeciwnowotworowe, prowadzące do nadekspresji TF i utraty właściwości przeciwzkrzepowych, wydaje się być najważniejszą przyczyną zakrzepicy związanej z leczeniem przeciwnowotworowym. Chociaż obecne leczenie przeciwnowotworowe jest skuteczną i niezawodną metodą leczenia raka piersi, u pacjentek otrzymujących terapię uzupełniającą występuje zwiększone ryzyko zakrzepicy, niezależnie od biologii nowotworu [158, 186–189].

## II. Cel pracy

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet na całym świecie. Powszechne leczenie raka piersi obejmuje określone schematy terapeutyczne stosowane w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu oraz charakterystyki histologicznej i molekularnej tkanki nowotworowej. Ustalone markery prognostyczne w raku piersi obejmują stan węzłów chłonnych, wielkość guza, stopień złośliwości histologicznej, stopień zaawansowania klinicznego, a także status receptorów hormonalnych oraz status HER2. Jednakże ocena rokowania raka piersi przy pomocy tradycyjnych wskaźników w dalszym ciągu pozostaje niesatysfakcjonująca, a w przypadku niektórych podtypów raka piersi nadal brakuje specyficznych terapeutycznych celów molekularnych. Zatem istotne jest zidentyfikowanie dodatkowych biomarkerów prognostycznych umożliwiających skuteczne przewidzenie przyszłego przebiegu choroby nowotworowej oraz dobór spersonalizowanego leczenia.

Badania prowadzone w ciągu ostatnich pięciu dekad wykazały istotną zależność pomiędzy występowaniem choroby nowotworowej a funkcjonowaniem układu hemostatycznego. U kobiet chorych na raka piersi związek między nowotworem a układem hemostatycznym jest coraz częściej uznawany za ważny i niezależny czynnik regulujący progresję raka piersi. W rzeczywistości, elementy układu hemostatycznego, w tym płytki krwi oraz czynniki układu krzepnięcia i fibrynolizy, mogą wpływać na wiele procesów pośredniczących w progresji raka piersi.

Celem pracy była próba określenia wartości prognostycznej przy zastosowaniu analizy krzywej ROC, estymacji Kaplana-Meiera, regresji Coxa oraz regresji logistycznej i liniowej wybranych czynników hemostatycznych, w tym elementów układu krzepnięcia: TF i TFPI oraz fibrynolizy: t-PA, u-PA i PAI-1 u pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi oraz ocena wpływu zastosowanego leczenia uzupełniającego na ich stężenie i aktywność. Dodatkowo przeprowadzono analizę porównawczą wybranych czynników hemostatycznych w odniesieniu do parametrów demograficzno-antropometrycznych oraz kliniczno-patologicznych w obrębie badanej grupy zarówno przed leczeniem, jak i po leczeniu.

### III. Cykl publikacji

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

**„Ocena wartości prognostycznej wybranych czynników hemostatycznych oraz zmiana ich stężenia w odpowiedzi na zastosowane leczenie uzupełniające u pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi”**

Osiągnięcie naukowe składa się z dwóch prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR). Sumaryczny współczynnik oddziaływania, **impact factor (IF) wynosi 7,1, punktacja MNiSW – 210 pkt.**

1. **Wrzeszcz K**, Słomka A, Zarychta E, Rhone P, Ruszkowska-Ciastek B. Tissue plasminogen activator as a possible indicator of breast cancer relapse: A preliminary, prospective study. J Clin Med. 2022; 11(9): 2398. **[IF: 3,9; MNiSW: 140 pkt. (praca oryginalna)]**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: częściowym opracowaniu koncepcji artykułu, przeglądzie piśmiennictwa, przeprowadzeniu analizy statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, częściowym opracowaniu pierwszej wersji tekstu artykułu oraz redagowaniu wersji manuskryptu uwzględniającej uwagi recenzentów.

Mój procentowy udział w realizacji pracy szacuję na **75%**.

2. **Wrzeszcz K**, Rhone P, Kwiatkowska K, Ruszkowska-Ciastek B. Hypercoagulability state combined with post-treatment hypofibrinolysis in invasive breast cancer: a seven-year follow-up evaluating disease-free and overall survival. Life. 2023; 13(5): 1106. **[IF: 3,2; MNiSW: 70 pkt. (praca oryginalna)]**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na częściowym opracowaniu koncepcji artykułu, przeglądzie piśmiennictwa, przeprowadzeniu analizy statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników, opracowaniu pierwszej wersji tekstu artykułu oraz redagowaniu wersji manuskryptu uwzględniającej uwagi recenzentów.

Mój procentowy udział w realizacji pracy szacuję na **75%**.



## Ogólna charakterystyka grupy badanej w pracy numer 1 i 2

W publikacji numer 1 i 2 badaniem o charakterze obserwacyjnym i prospektywnym objęto pacjentki z rozpoznaniem pierwotnym, jednostronnym, inwazyjnym rakiem piersi bez przerzutów odległych. Pacjentki były diagnozowane i rekrutowane z Oddziału Klinicznego Nowotworu Piersi i Chirurgii Rekonstrukcyjnej w Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy w okresie od listopada 2015 roku do czerwca 2017 roku. Pacjentki z populacji objętej badaniem obserwowano od momentu rozpoznania raka piersi do chwili nawrotu choroby nowotworowej lub zgonu. Okres obserwacji liczony był od daty rozpoznania inwazyjnego raka piersi do dnia ostatniego kontaktu. Czas od włączenia do badania do daty nawrotu choroby określono jako czas przeżycia wolnego od choroby, a czas do ostatniej wizyty lub śmierci pacjentki określono jako całkowity czas przeżycia.

Zasadniczym kryterium włączenia do badania był (1) pierwotny, (2) jednostronny, (3) inwazyjny rak piersi w stopniu I, maksymalnie II. Kryteriami wykluczenia były: (1) przedoperacyjne stwierdzenie przerzutów odległych lub innego guza pierwotnego, (2) chemioterapia lub radioterapia neoadjuwantowa, (3) niepełne dane kliniczne z obserwacji, (4) stopień zaawansowania klinicznego IIIA lub wyższy, (5) stopień złośliwości histologicznej G3, (6) rak in situ, (7) guz większy niż 5 cm.

U każdej zakwalifikowanej do badania pacjentki oceniono lokalizację, wielkość guza, stan regionalnych węzłów chłonnych oraz wszystkie niezbędne parametry z klasyfikacji histologicznej, Elston-Ellis, TNM oraz molekularnej.

Wszystkie pacjentki z rakiem piersi uwzględnione w badaniu zostały poddane chirurgicznemu usunięciu guza. W celach operacyjnych wykorzystano mastektomię, operację oszczędzającą pierś lub zmodyfikowaną radykalną mastektomię. Żadna z pacjentek nie była leczona terapią neoadjuwantową. Po przeprowadzeniu pierwotnej operacji zastosowano pooperacyjne leczenie uzupełniające, składające się z radioterapii, brachyterapii, terapii hormonalnej, chemioterapii lub immunoterapii w zależności od profilu nowotworu.

Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi lokalnej Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy (KB/547/2015).

## **Wprowadzenie do badania opublikowanego w pracy nr 1:**

**Wrzeszcz K**, Słomka A, Zarychta E, Rhone P, Ruszkowska-Ciastek B. Tissue plasminogen activator as a possible indicator of breast cancer relapse: A preliminary, prospective study. *J Clin Med*. 2022; 11(9): 2398. [IF: 3,9; MNiSW: 140 pkt.]

Inwazyjny rak piersi jest istotnym problemem zdrowotnym związanym z wysoką globalną zachorowalnością i śmiertelnością wśród kobiet. W ostatnich latach poczyniono postępy w opracowaniu nowych leków ukierunkowanych na molekularne podtypy raka piersi, jednakże progностyczna perspektywa w przypadku bardziej zaawansowanych nowotworów nadal pozostaje niekorzystna, a prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia w tych przypadkach nie przekracza 28%.

Powszechnie wiadomo, że mechanizm odpowiedzialny za wzrost i rozprzestrzenianie się raka piersi jest bardzo złożony i wieloetapowy. Dane dostępne w literaturze podkreślają, że zaburzenia układu hemostazy mogą odgrywać zasadniczą rolę w naturalnym przebiegu tej choroby. Wielu badaczy skupia swoją uwagę na ocenie procesu krzepnięcia krwi u pacjentek z rozpoznaniem rakiem piersi. Obserwacje te są spójne i wykazują, że pacjentki z rakiem piersi są obarczone wysokim ryzykiem rozwoju stanu nadkrzepliwości, co istotnie zwiększa prawdopodobieństwo powikłań zakrzepowo-zatorowych, dodatkowo wzmocnionych stosowaną terapią przeciwnowotworową. Ryzyko incydentów prozakrzepowych związanych z nowotworem jest silnie powiązane z hipofibrinolizą wyrażającą się zmniejszonym wydzielaniem aktywatorów plazminogenu i wzmocnieniem działania jego inhibitorów.

Parametry laboratoryjne rutynowo stosowane do oceny krzepliwości krwi mogą potencjalnie stanowić silne czynniki diagnostyczne i prognostyczne w przebiegu raka piersi. Właściwości takie przypisuje się m.in. czynnikowi tkankowemu, czynnikowi von Willebranda oraz czynnikom krzepnięcia V i VIII.

Pomimo postępu wiedzy na temat zaburzeń krzepnięcia krwi, dokładna rola procesu fibrynolitycznego w patofizjologii, diagnostyce i rokowaniu raka piersi pozostaje niejasna. Pojedyncze badania kliniczne oceniają głównie osoczowe stężenie inhibitora aktywatora plazminogenu-1, głównego inhibitora fibrynolizy. Wykazano, że PAI-1 może być wysoce przydatny klinicznie w diagnostyce i prognozowaniu raka piersi. Rola innych elementów biorących udział w procesie upłynniania skrzepu krwi jest słabo poznana. Chociaż badano

wartość prognostyczną t-PA, u-PA lub PAI-1 w różnych nowotworach, to ich szczególna wartość dla oceny rokowania we wczesnym stadium inwazyjnego raka piersi nie została w pełni wyjaśniona. Istnieje znacząca luka w badaniach nad rolą układu fibrynolitycznego w raku piersi, biorąc pod uwagę kilka parametrów laboratoryjnych, takich jak t-PA, u-PA, PAI-1, a zwłaszcza kompleks PAI-1/t-PA oraz PAI-1/u-PA.

**W publikacji numer 1** badaniem o charakterze obserwacyjnym objęto 41 kobiet w wieku 45-69 lat (mediana 56 lat) z rozpoznaniem pierwotnym, jednostronnym, inwazyjnym rakiem piersi bez przerzutów odległych. W okresie obserwacji, którego mediana wynosiła 66 miesięcy (IQR 59–68 miesięcy), odnotowano dziewięć zdarzeń, w tym cztery przypadki wznowy choroby nowotworowej wyrażonej jako obecność przerzutów odległych oraz pięć zgonów spowodowanych ogólnoustrojową chorobą przerzutową. Współczynnik częstości nawrotów wynosił 22%.

Najczęstszym podtypem molekularnym raka piersi wśród pacjentek objętych badaniem był podtyp luminalny A, potwierdzony u 26 pacjentek (63%), a najczęstszym stopniem histologicznym według klasyfikacji Elstona-Ellisa był stopień G2, zdiagnozowany u 31 przypadków (76%). Średnica guzów wahała się od 0,5 do 3,5 cm, przy medianie wielkości 1,6 cm, przy czym u większości pacjentek (59%) średnica guza wynosiła < 2 cm. Według klasyfikacji TNM, 16 pacjentek (39%) znajdowało w stadium I, a 61% w stadium II zaawansowania klinicznego nowotworu.

W ramach badania oceniono aktywność oraz stężenie podstawowych elementów układu fibrynolitycznego: t-PA, u-PA, PAI-1, PAI-1/t-PA oraz PAI-1/u-PA. Do analizy wszystkich parametrów układu fibrynolitycznego wykorzystano dostępne na rynku zestawy do testów immunoenzymatycznych (ELISA).

Celem pracy była analiza aktywności oraz stężenia podstawowych elementów układu fibrynolitycznego oraz próba określenia wartości prognostycznej tych czynników w przewidywaniu ryzyka nawrotu choroby nowotworowej u pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi. Dodatkowo sporządzono analizę porównawczą wybranych czynników fibrynolitycznych w odniesieniu do parametrów kliniczno-patologicznych, takich jak obecność przerzutów do węzłów chłonnych, rozmiar guza, stopień złośliwości histologicznej, stopień zaawansowania klinicznego czy status receptorów ER i PR.

Uzyskane dane zostały ocenione za pomocą zaawansowanych narzędzi statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem krzywej ROC, wykresów

Kaplana-Meiera, regresji Coxa, regresji logistycznej oraz wielokrotnych modeli regresji liniowej.

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej, w pierwszej publikacji przy wykorzystaniu krzywej ROC za najsilniejszy predyktor nawrotu choroby wśród badanych elementów fibrynolitycznych uznano t-PA (AUC = 0,799;  $p < 0,0006$ ), którego stężenie na poziomie 1,37 ng/ml ze swoistością 65,6% i czułością 88,9% uznano za najlepszą wartość odcięcia pozwalającą na odróżnienie pacjentek z nawrotem choroby od pacjentek bez nawrotu choroby nowotworowej. Pola pod krzywą ROC dla aktywności PAI-1, antygenu PAI-1, aktywności u-PA, antygenu u-PA, kompleksu PAI-1/u-PA i kompleksu PAI-1/t-PA były mniejsze niż AUC dla antygenu t-PA. Niemniej jednak dla wszystkich ocenianych parametrów wartość AUC była wyższa od granicy przydatności prognostycznej testu  $AUC^{ROC} > 0,5$ , jednakże wartość  $p$  dla tych parametrów wynosiła  $p > 0,05$ , w związku z tym dla tych parametrów nie osiągnięto silnej mocy prognostycznej umożliwiającej przewidywanie nawrotu raka piersi.

Wykorzystując analizę krzywych Kaplana-Meiera oraz test long-rank zaobserwowano różnice w funkcjach przeżycia w przypadku aktywność PAI-1 oraz stężenia antygenu t-PA. Pacjentki z aktywnością PAI-1 poniżej 3,04 U/ml charakteryzowały się znacząco dłuższym czasem przeżycia wolnym od choroby w porównaniu z pacjentkami z aktywnością PAI-1 powyżej 3,04 U/ml ( $p = 0,0412$ ). Z kolei w kontekście biomarkera t-PA, prawdopodobieństwo przeżycia bez nawrotu choroby nowotworowej było zdecydowanie niższe u pacjentek ze stężeniem t-PA poniżej 1,37 ng/ml lub 1,41 ng/ml (w zależności od zastosowanego punktu odcięcia - mediany lub indeksu Youdena). Pacjentki ze stężeniem t-PA  $> 1,37$  ng/ml lub  $> 1,41$  ng/ml charakteryzowały się istotnie dłuższym czasem wolnym od choroby nowotworowej (odpowiednio  $p = 0,0029$ ;  $p = 0,0086$ ).

Wyniki te zostały oparte o dalsze testy statystyczne. Przy zastosowaniu jednoczynnikowego modelu regresji Coxa wykazano, że antygen t-PA jest istotnie powiązany z dłuższym czasem wolnym od choroby (HR = 0,10, 95% CI = 0,01–0,83,  $p = 0,0323$ ). Zgodnie z tymi wynikami, pacjentki ze stężeniem t-PA wyższym niż 1,41 ng/ml są o 90% mniej narażone na wystąpienie wznowy nowotworu piersi w porównaniu z pacjentkami z niższym stężeniem t-PA. W oparciu o regresję logistyczną, stwierdzono, że jedynie wartość antygenu t-PA ma istotny związek z długością czasu przeżycia wolnego od choroby. Odnotowano, że wzrost stężenia antygenu t-PA o 1 ng/ml zmniejsza ryzyko nawrotu raka piersi o 0,06 (OR) (95% CI = 0,01 do 0,68;  $p = 0,0209$ ). Wyniki te zostały ostatecznie potwierdzone modelem regresji

liniowej. W modelu wieloczynnikowej analizy regresji liniowej skorygowanym o wiek, BMI, liczbę porodów, stan menopauzalny oraz palenie tytoniu, ryzyko wznowy raka piersi było powiązane ze stężeniem t-PA w sposób odwrotnie proporcjonalny (standaryzowany współczynnik Beta =  $-0,3815$ ;  $p = 0,0227$ ).

**Z przeprowadzonych badań wynika, że wyższe stężenie t-PA w osoczu kobiet z rakiem piersi jest istotnie powiązane z korzystnym rokowaniem w aspekcie czasu wolnego od choroby nowotworowej. Wykazano, że tkankowy aktywator plazminogenu jest biomarkerem o wysokim potencjale prognostycznym pozwalającym na przewidzenie przebiegu raka piersi, w tym oszacowanie ryzyka wystąpienia przerzutów. Dodatkowo odnotowano, że niższa aktywność PAI-1 jest powiązana z lepszymi wynikami klinicznymi. Przypuszcza się, że w przypadkach, w których występuje wyższe stężenie t-PA lub niższa aktywność PAI-1, istnieje możliwość nasilenia procesu fibrynolizy, co wiąże się z lepszym rokowaniem.**



Article

# Tissue Plasminogen Activator as a Possible Indicator of Breast Cancer Relapse: A Preliminary, Prospective Study

Katarzyna Wrzeszcz <sup>1</sup>, Artur Słomka <sup>1</sup>, Elżbieta Zarychta <sup>1</sup>, Piotr Rhone <sup>2</sup> and Barbara Ruszkowska-Ciastek <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum, 85-094 Bydgoszcz, Poland; katarzyna.wrzeszcz@abs.umk.pl (K.W.); artur.slomka@em.umk.pl (A.S.); zarychta@abs.umk.pl (E.Z.)

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

\* Correspondence: ruszkowska.basia@gmail.com

**Simple Summary:** Breast cancer is the most common malignant neoplasm and the leading cause of cancer death in women worldwide. The heterogeneity of breast cancer is a significant challenge facing modern medicine, especially at the stage of diagnosis. In recent years, a substantial role of fibrinolytic biomarkers in the pathogenesis of breast cancer has been proved as the primary cause capable of initiating local recurrence and metastasis to other organs. Due to its proteolytic properties, fibrinolytic protein activity may lead to subendothelial layer degradation and promote neoplastic cell motility. Thus, we examined the fibrinolytic profile markers' prognostic value in predicting the disease's relapse. Our studies indicate that the t-PA antigen and PAI-1 activity are biomarkers with high prognostic potential. We showed that a lower baseline plasma concentration of t-PA antigen and higher PAI-1 activity might be strong predictors for distant metastases and independent prognostic markers in breast cancer patients.



**Citation:** Wrzeszcz, K.; Słomka, A.; Zarychta, E.; Rhone, P.; Ruszkowska-Ciastek, B. Tissue Plasminogen Activator as a Possible Indicator of Breast Cancer Relapse: A Preliminary, Prospective Study. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 2398. <https://doi.org/10.3390/jcm11092398>

Academic Editor: Ramon Andrade De Mello

Received: 26 February 2022

Accepted: 21 April 2022

Published: 25 April 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/>).

**Abstract:** (1) Background: The fundamental causes of breast cancer mortality are the cancer spread and hypercoagulability state. The study aimed to evaluate the prognostic efficacy of the fibrinolytic profile concerning 5-year follow-up. (2) Methods: We investigated the predictive potential of the plasma activity of urokinase plasminogen activator (u-PA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) as well as antigen of tissue plasminogen activator (t-PA), u-PA, PAI-1, and PAI-1/t-PA and PAI-1/u-PA complexes in 41 breast cancer patients. The median follow-up was 66 months, with full evidence of the first event. (3) Results: A significantly lower level of PAI-1 antigen was noted in IBrc patients with lymph node involvement (N1) than in patients with free lymph node metastases (N0). According to ROC curve analysis, a t-PA antigen was the strongest predictor of disease relapse (the area under the curve, AUC = 0.799;  $p < 0.0006$ ). Patients with PAI-1 activity  $< 3.04$  U/mL had significantly better disease-free survival (DFS) compared to those with PAI-1 activity  $> 3.04$  U/mL. Patients with both t-PA antigen lower than 1.41 ng/mL (cut-off according to median value) and lower than 1.37 ng/mL (cut-off according to ROC curve) had significantly shorter DFS ( $p = 0.0086$ ;  $p = 0.0029$ ). (4) Conclusions: The results suggest that a higher plasma t-PA antigen level or lower PAI-1 activity are linked to better outcomes in breast cancer patients.

**Keywords:** fibrinolytic profile; 5-year follow-up; invasive breast cancer

## 1. Introduction

Invasive breast cancer (IBrc) is a relevant health issue associated with high global cancer morbidity and mortality among women [1]. Advances have been made in the molecular characterisation and development of novel targeted agents for the IBrc intrinsic subtypes; however, future perspectives for the advanced disease remain poor, with 5-year survival not extending beyond 28% in those cases [2].



It is well-established that the growth and dissemination of breast cancer are highly complex and multi-staged [3]. The data found in the literature emphasize that disturbances in haemostasis may play a fundamental role in the natural course of the disease [4,5]. Most researchers focus their attention on evaluating blood coagulation in patients with IBrC. These observations are consistent and have shown that patients with IBrC are at high risk of hypercoagulability state development, which significantly increases the likelihood of thromboembolic complications, additionally reinforced by the applied therapy [4,6–9]. The cancer-related prothrombotic threat is strongly linked with hypofibrinolysis expressed by diminished secretion of plasminogen activators and enhancement of its inhibitors [10].

Importantly, our studies [11,12] and other research teams [13,14] have shown that laboratory parameters determining blood coagulation could be diagnostic and prognostic factors in breast cancer. Such properties are attributed to, among others, tissue factor (TF) [11], von Willebrand factor (vWf) [12], and coagulation factors V (FV) [14] and FVIII [13].

Despite the advances in the knowledge of blood coagulation imbalances, the precise role of the fibrinolytic process in the pathophysiology, diagnostics, and prognosis of breast cancer remains obscure. Single clinical studies have mainly assessed the plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), the primary fibrinolysis inhibitor [15–18]. It has been shown that PAI-1 may be highly clinically useful in the diagnosis and prognosis of breast cancer [17,18]. The role of the other elements involved in the blood clot liquefaction process is poorly understood, although Look et al. showed that tissue plasminogen activator (t-PA) and urokinase plasminogen activator (u-PA) [17], and Ruszkowska-Ciastek et al. [18] demonstrated that t-PA, might also be prognostic indicators in breast cancer.

Although the prognostic value of t-PA, u-PA or PAI-1 has been studied in various cancers, its particular value for prognosis evaluation in early-stage of IBrC has not been fully elucidated. There is a significant gap in the studies of the role of the fibrinolytic system in breast cancer, considering several laboratory parameters such as t-PA, u-PA, PAI-1, and especially the PAI-1/t-PA and PAI-1/u-PA complexes. Thus, the objective of the current study was to evaluate the prognostic efficacy of the fibrinolytic profile concerning 5-year follow-up.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Participants and Design

This study was carried out on a prospective series of 41 primary IBrC cases diagnosed between November 2015 and June 2017 by the Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre in Bydgoszcz, Poland. All of the patients enrolled were women and received surgical and adjuvant treatment. All subjects were of Polish descent. All participants were interviewed by an oncologist with expertise in breast cancer, and blood samples were drawn for fibrinolysis parameters analysis between 2015 and 2017. The tumour, node, metastasis (TNM) classification, histological grade, oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), proliferative activity (Ki67), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status were provided by the Pathology Department of Oncology Center (Table 1). Tumour staging was defined according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC; 7th ed.). Tumour size was evaluated according to the maximum tumour dimension.

**Table 1.** Patient characteristics.

| Demographic and Clinical Data | Total (n = 41; 100% of European Ancestry) |
|-------------------------------|---|
| Age (according to median)     |   |
| <56                           | 18 (44%)                                  |
| ≥56                           | 23 (56%)                                  |
| Menopausal status             |   |
| pre-menopause                 | 12 (29%)                                  |
| post-menopause                | 29 (71%)                                  |

**Table 1.** *Cont.*

| Demographic and Clinical Data   | Total (n = 41; 100% of European Ancestry) |
|---------------------------------|---|
| T status (7th ed.)              |   |
| T1                              | 24 (59%)                                  |
| T2                              | 17 (41%)                                  |
| N status (7th ed.)              |   |
| N0                              | 28 (68%)                                  |
| N1                              | 13 (32%)                                  |
| Stage (7th ed.)                 |   |
| IA                              | 16 (39%)                                  |
| IIA+IIB                         | 25 (61%)                                  |
| Molecular components            |   |
| ER (+)                          | 37 (90%)                                  |
| ER (−)                          | 4 (10%)                                   |
| PR (+)                          | 33 (80%)                                  |
| PR (−)                          | 8 (20%)                                   |
| HER2 (+)                        | 5 (12%)                                   |
| HER2 (−)                        | 36 (88%)                                  |
| Proliferation marker expression |   |
| Ki67 < 20%                      | 29 (71%)                                  |
| Ki67 ≥ 20%                      | 12 (29%)                                  |
| Histological grade              |   |
| 1                               | 10 (24%)                                  |
| 2                               | 31 (76%)                                  |
| Histological type               |   |
| Ductal                          | 35 (85%)                                  |
| Lobular                         | 6 (15%)                                   |
| Tumour localisation             |   |
| Left breast                     | 19 (46%)                                  |
| Right breast                    | 22 (54%)                                  |

N0: lack of lymph node metastases; N1: spread to axillary lymph nodes; T1: tumour diameter ≤ 2 cm; T2: tumour diameter > 2 cm to ≤ 5 cm; ER: oestrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; Ki67: proliferation marker; G1: low grade; G2: moderate grade.

## 2.2. Ethics

This study was performed based on the guidelines of the Declaration of Helsinki, and the Bioethics Committee of Collegium Medicum approved all procedures involving human subjects in Bydgoszcz, the Nicolaus Copernicus University in Toruń, Poland. Written informed consent was obtained from all participants before participating in the study.

## 2.3. Inclusion and Exclusion Factors

The essential inclusion criteria were primary, unilateral, invasive breast cancer in stage I maximum II. The exclusion criteria included (1) pre-operative findings of distant metastasis or another original tumour, (2) neoadjuvant chemotherapy or radiotherapy, (3) incomplete follow-up clinical data, (4) stage IIIA or higher, (5) grade 3, (6) carcinoma in situ, (7) tumour larger than 5 cm.

## 2.4. Study Outcomes and Follow-Up

Patients in the study population were followed from IBrc diagnosis to the date of breast cancer relapse or death or until 31 August 2021, whichever came first. Cumulative survival was presented by Kaplan–Meier graphs. During a median follow-up of 66.0 months (IQR 59–68 months), nine events occurred, including four (9.8%) distant metastases and five (12.2%) deaths. The recurrence rate was 22%.



2.5. Measurements

2.5.1. Blood Sampling and Laboratory Tests

Venous blood from patients was drawn before treatment, processed, and immediately analysed for routine procedures. The blood was collected between 7:30 and 9:30 a.m. and after 12 h overnight fasting. 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 6 months. Storage conditions were carefully maintained, and aliquots were limited to one freeze–thaw cycle at batch analysis.

2.5.2. Fibrinolytic Parameters

Commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to analyse all fibrinolytic system parameters. Table 2 presents the specific features of those parameters concerning the name of the kit, manufacturer, assay range, detection limit, intra-assay coefficient of variation (CV, %) and inter-assay coefficient of variation (CV, %).

**Table 2.** The basic quality of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits used in the present study.

| Kit  | Manufacturer                               | Assay Range    | Detection Limit | The Intra-Assay Coefficient of Variation (CV, %) | The Inter-Assay Coefficient of Variation (CV, %) |
|--|--|----------------|-----------------|--|--|
| Human PAI-1 Total Antigen ELISA Kit          | Molecular Innovations, Inc., Novi, MI, USA | 0.25–100 ng/mL | 0.122 ng/mL     | 3.13–7.89  | 3.83–8.10  |
| Human PAI-1 Activity ELISA Kit               |  | 0.125–100 U/mL | 0.113 U/mL      | 4.74–9.18  | 7.85–9.52  |
| Human u-PA Total Antigen ELISA Kit           |  | 0.1–50 ng/mL   | 0.019 ng/mL     | 2.77–7.16  | <15  |
| Human u-PA Activity ELISA Kit                |  | 0.1–50 ng/mL   | 0.013 U/mL      | 1.60–6.27  | 5.62–7.37  |
| Human t-PA Total Antigen ELISA Kit           |  | 0.2–25 ng/mL   | 0.0108 ng/mL    | <10  | <15  |
| Human PAI-1/u-PA 1 Complex Antigen ELISA Kit |  | 0.1–100 ng/mL  | 0.070 ng/mL     | <10  | <15  |
| Human PAI-1/t-PA Complex Antigen ELISA Kit   |  | 0.5–100 ng/mL  | 0.03 ng/mL      | <10  | <15  |

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1; t-PA: tissue plasminogen activator; u-PA: urokinase plasminogen activator.

2.5.3. Immunohistochemistry (IHC) Analysis

The estimation of oestrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) status, expression of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and Ki67-proliferation index utilized a standard procedure and was established by methods of immunohistochemistry (IHC). Hormone receptor status was defined as positive if at least 1% of tumour cells were noted with nuclear staining and negative if the nuclear staining was completely absent. HER2 status was classified as negative (score 0, 1+, and 2+ not amplified) or positive (when scored 3+ by IHC or HER2 amplified by fluorescence in situ hybridization (FISH)), according to the guideline for BC ASCO/CAP-2007. The Ki67 antigen was scored as a percentage of nuclei-stained cells of all the cancer cells by applying a monoclonal mouse antibody (Auto-stainer Link 48, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For the Ki67 proliferation index, we used a 20% threshold as the limit to define high/low proliferative cases [12].

## 2.6. Statistical Analysis

All statistical analyses were conducted using Statistica v. 13.1 (StatSoft, Cracow, Poland). The Shapiro–Wilk test tested the normality of the data. Data are presented as medians and interquartile ranges (IQR) for non-normally distributed variables. Differences between groups were analysed using the Mann–Whitney U-test. The analysis was carried out to assess disease-free survival (DFS). DFS (in months) was calculated as the time frame between the date of surgery or the date of loco-regional/distant relapse (second IBrC, second primary cancer, and/or death without evidence of BC) to the date of the last contact. DFS curves were computed using the Kaplan–Meier method and compared using the log-rank test. The receiver operating characteristic (ROC) curves for all fibrinolytic parameters were plotted. The strength of associations was estimated by ROC analysis and expressed in terms of area under the ROC curve (AUC). AUC was calculated to assess the prognostic value. Optimal cut-off values were defined. Multivariate regression analysis was performed using Cox proportional hazards model. A multivariate Cox regression model included all variables with a significant effect in the univariate analysis to evaluate the independent impact of selected factors at the diagnosis on survival from breast cancer.

Additionally, the results were supported by further statistical analyses, including a univariate logistic regression analysis, which was used to predict the risk of developing breast cancer recurrence based on fibrinolytic factors. Multiple linear regression models with each fibrinolytic factor as an independent variable after adjusting for age, BMI, smoking, parity, menopausal status, tumour stage, tumour diameters, intrinsic type, histological type, and nodal involvement were also applied. The statistical significance level was  $p$ -value < 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Recruitment and Participation

The basic characteristics of the participants are shown in Table 1. The average age of the participants was 56 years (IQR 51–60 years). The median BMI was 25.22 kg/m<sup>2</sup> (IQR, 23.05–29.27 kg/m<sup>2</sup>). Tumour sizes ranged from 0.5 to 3.5 cm, with median size of 1.6 cm (IQR: 1.1–2.2 cm). Most of the tumours were <2 cm (24 cases, 59%). According to AJCC 7th edition for breast cancer, 16 patients (39%) were in stage I, and 25 (61%) were in stage II. The most common intrinsic/molecular subtype of breast cancer was luminal-A, confirmed in 26 subjects (63%), and the most common histological grade according to Elston–Ellis classification was G2, diagnosed in 31 cases (76%). The median follow-up duration for disease-free survival was 66 months (IQR, 59–68 months). Nine patients (22%) developed a relapse. Among them, three (7%) cases were diagnosed as luminal A subtype; in five (12%) subjects, luminal B HER2 (–) subtype was recognised, and only one (2%) patient had the luminal B-like HER2 (+) subtype of IBrC. None of the relapse patients had a triple-negative IBrC.

### 3.2. Clinical Presentation of Patients with Regard to Fibrinolytic Parameters

Table 3 presents variabilities in the antigen (concentration) and activity of fibrinolytic parameters concerning clinical and molecular characteristics. IBrC patients with lymph node involvement (N1) demonstrated a significantly lower level of PAI-1 antigen than patients with free lymph node metastases (N0) ( $p = 0.0412$ ). The activity of PAI-1 was more than twofold higher in patients with luminal A IBrC than in other-molecular-types cases ( $p = 0.0410$ ). However, there was a tendency toward a lower antigen of PAI-1 ( $p = 0.0565$ ) in patients with grade 2 tumours compared to those with grade 1.

**Table 3.** The fibrinolytic profile analysis with respect to clinicopathological features.

| Variables of Interest    | PAI-1 Activity [U/mL]<br><i>p</i> -Value | PAI-1 Antigen [ng/mL]<br><i>p</i> -Value | t-PA Antigen [ng/mL]<br><i>p</i> -Value | u-PA Activity [U/mL]<br><i>p</i> -Value | u-PA Antigen [ng/mL]<br><i>p</i> -Value | PAI-1/u-PA Complex [ng/mL]<br><i>p</i> -Value | PAI-1/t-PA Complex [ng/mL]<br><i>p</i> -Value |
|--------------------------|--|--|---|---|---|---|---|
| N0<br>N1                 | 6.32<br>1.65/13.12<br>6.05               | 51.24<br>35.81/100.00<br>29.33           | 1.51<br>1.20/1.75<br>1.33               | 0.79<br>0.60/1.23<br>0.98               | 0.41<br>0.24/0.73<br>0.47               | 2.58<br>1.51/3.88<br>2.98                     | 0.73<br>0.30/1.24<br>0.99                     |
|                          | 3.31/9.50<br><i>p</i> = 0.9442           | 23.76/48.36<br><b><i>p</i> = 0.0412</b>  | 1.12/1.57<br><i>p</i> = 0.2324          | 0.67/1.20<br><i>p</i> = 0.7474          | 0.27/0.74<br><i>p</i> = 0.9442          | 1.66/5.65<br><i>p</i> = 0.2565                | 0.46/1.69<br><i>p</i> = 0.6042                |
|                          | 5.51<br>1.67/13.07<br>7.58               | 48.97<br>28.44/91.64<br>42.18            | 1.55<br>1.25/1.73<br>1.32               | 0.92<br>0.72/1.23<br>0.78               | 0.44<br>0.23/0.74<br>0.40               | 2.77<br>1.54/4.51<br>2.60                     | 0.90<br>0.32/1.71<br>0.67                     |
| T1<br>T2                 | 3.39/10.83<br><i>p</i> = 0.5694          | 29.56/91.67<br><i>p</i> = 0.9052         | 0.98/1.52<br><i>p</i> = 0.1216          | 0.55/1.03<br><i>p</i> = 0.3210          | 0.28/0.72<br><i>p</i> = 0.9262          | 1.62/5.23<br><i>p</i> = 0.8015                | 0.33/1.18<br><i>p</i> = 0.5168                |
|                          | 6.32<br>1.48/19.41<br>3.05               | 58.03<br>40.84/100.00<br>39.03           | 1.55<br>1.34/1.75<br>1.33               | 0.84<br>0.72/1.45<br>0.91               | 0.38<br>0.23/0.79<br>0.47               | 2.58<br>1.54/3.76<br>2.96                     | 0.79<br>0.25/1.47<br>0.89                     |
|                          | 3.31/9.50<br><i>p</i> = 0.9680           | 25.37/68.37<br><i>p</i> = 0.0931         | 0.98/1.57<br><i>p</i> = 0.1606          | 0.55/1.06<br><i>p</i> = 0.2779          | 0.27/0.72<br><i>p</i> = 0.9893          | 1.62/5.65<br><i>p</i> = 0.3565                | 0.46/1.27<br><i>p</i> = 0.9255                |
| Stage I<br>Stage II      | 3.19<br>1.33/14.52<br>6.92               | 85.80<br>45.18/100.00<br>41.94           | 1.48<br>1.22/1.73<br>1.41               | 0.92<br>0.73/1.57<br>0.86               | 0.47<br>0.32/0.84<br>0.40               | 1.86<br>0.89/4.26<br>2.94                     | 0.90<br>0.23/1.73<br>0.82                     |
|                          | 3.31/11.74<br><i>p</i> = 0.2189          | 25.37/68.37<br><i>p</i> = 0.0565         | 1.10/1.68<br><i>p</i> = 0.7488          | 0.55/1.06<br><i>p</i> = 0.0904          | 0.25/0.74<br><i>p</i> = 0.5744          | 1.62/5.65<br><i>p</i> = 0.1767                | 0.33/1.27<br><i>p</i> = 0.8198                |
|                          | 6.12<br>3.04/11.74<br>4.56               | 48.10<br>27.54/83.27<br>66.19            | 1.41<br>1.12/1.68<br>1.77               | 0.91<br>0.64/1.20<br>0.75               | 0.39<br>0.25/0.72<br>0.73               | 2.56<br>1.59/4.59<br>3.88                     | 0.89<br>0.27/1.27<br>0.71                     |
| ER (+)<br>ER (-)         | 1.16/10.57<br><i>p</i> = 0.4419          | 34.52/96.68<br><i>p</i> = 0.5219         | 1.04/2.46<br><i>p</i> = 0.1156          | 0.59/1.21<br><i>p</i> = 0.7088          | 0.57/0.93<br><i>p</i> = 0.5531          | 3.05/5.41<br><i>p</i> = 0.2105                | 0.62/1.99<br><i>p</i> = 0.7584                |
|                          | 6.12<br>3.31/12.68<br>5.16               | 48.10<br>27.54/91.67<br>46.06            | 1.41<br>1.12/1.68<br>1.39               | 0.93<br>0.67/1.26<br>0.73               | 0.37<br>0.25/0.74<br>0.57               | 2.50<br>1.59/4.59<br>3.37                     | 0.89<br>0.27/1.28<br>0.71                     |
|                          | 1.62/8.40<br><i>p</i> = 0.3157           | 34.52/73.28<br><i>p</i> = 0.9604         | 1.04/2.19<br><i>p</i> = 0.3189          | 0.53/0.87<br><i>p</i> = 0.2429          | 0.45/0.80<br><i>p</i> = 0.8051          | 2.58/5.41<br><i>p</i> = 0.3656                | 0.45/1.17<br><i>p</i> = 1.0000                |
| PR (+)<br>PR (-)         | 6.12<br>1.79/11.74<br>6.66               | 45.18<br>29.33/68.37<br>60.77            | 1.52<br>1.29/1.68<br>1.24               | 0.96<br>0.55/1.26<br>0.76               | 0.39<br>0.26/0.67<br>0.63               | 2.89<br>1.62/4.59<br>2.58                     | 0.89<br>0.38/1.27<br>0.71                     |
|                          | 2.67/11.39<br><i>p</i> = 0.9886          | 26.88/96.68<br><i>p</i> = 0.5941         | 1.01/1.75<br><i>p</i> = 0.6432          | 0.70/1.07<br><i>p</i> = 0.6364          | 0.30/0.81<br><i>p</i> = 0.3980          | 1.41/4.75<br><i>p</i> = 0.8974                | 1.41/4.75<br><i>p</i> = 0.7526                |
|                          | 8.26<br>3.31/13.46<br>3.53               | 45.02<br>25.37/71.60<br>49.84            | 1.45<br>1.29/1.68<br>1.18               | 0.81<br>0.56/1.06<br>0.93               | 0.32<br>0.22/0.67<br>0.59               | 2.60<br>1.59/4.59<br>3.24                     | 0.77<br>0.27/1.21<br>0.89                     |
| Luminal A<br>Other types | 1.58/7.27<br><b><i>p</i> = 0.0410</b>    | 38.84/100.00<br><i>p</i> = 0.2948        | 0.90/1.78<br><i>p</i> = 0.8989          | 0.73/1.30<br><i>p</i> = 0.6357          | 0.40/0.88<br><i>p</i> = 0.0530          | 1.64/6.56<br><i>p</i> = 0.5072                | 0.56/1.73<br><i>p</i> = 0.3863                |

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1; t-PA: tissue plasminogen activator; u-PA: urokinase plasminogen activator; N0: lack of lymph node metastases; N1: spread to axillary lymph nodes; T1: tumour diameter ≤ 2 cm; T2: tumour diameter > 2 cm to ≤ 5 cm; ER: oestrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; Ki67: proliferation marker; G1: low grade; G2: moderate grade; Data are expressed as median (Me) and the inter-quartile range (IQR) [lower quartile (Q1)/upper quartile (Q3)]; bold *p*-values denote significant differences.

### 3.3. Fibrinolytic Parameters as Potential Markers of Breast Cancer Progression

The ROC curve was designed to estimate the prognostic value of the studied fibrinolytic parameters to predict the disease-free survival in breast cancer patients. The calculated areas under the curve (AUC) specified 95% confidence intervals. Based on the results of the assessment of the correctness of the investigated classifiers, the t-PA antigen was

considered the strongest predictor of disease relapse ( $AUC = 0.799$ ;  $p < 0.0006$ ). Using the maximum value of the Youden index, t-PA antigen of 1.37 ng/mL with a specificity of 65.6% and a sensitivity of 88.9% was identified as the best cut-off value to distinguish patients with disease recurrence from those without disease relapse. The areas under the ROC curve for the PAI-1 activity, PAI-1 antigen, u-PA activity, u-PA antigen, PAI-1/u-PA complex, and PAI-1/t-PA complex were lower than the AUC for the t-PA antigen. Nevertheless, for all parameters assessed, the AUC was higher than the borderline of prognostic usefulness of the test  $AUC^{ROC} > 0.5$ . Therefore, based on the Youden index, the cut-off point values were provided for all studied variables to discriminate between relapse-free patients and those with relapse (Table 4). Although the  $AUC^{ROC}$  values for these mentioned parameters were above 0.5, the  $p$ -values were  $>0.05$ ; thus, the strong prognostic power for the prediction of disease relapse was not reached (Figure 1).

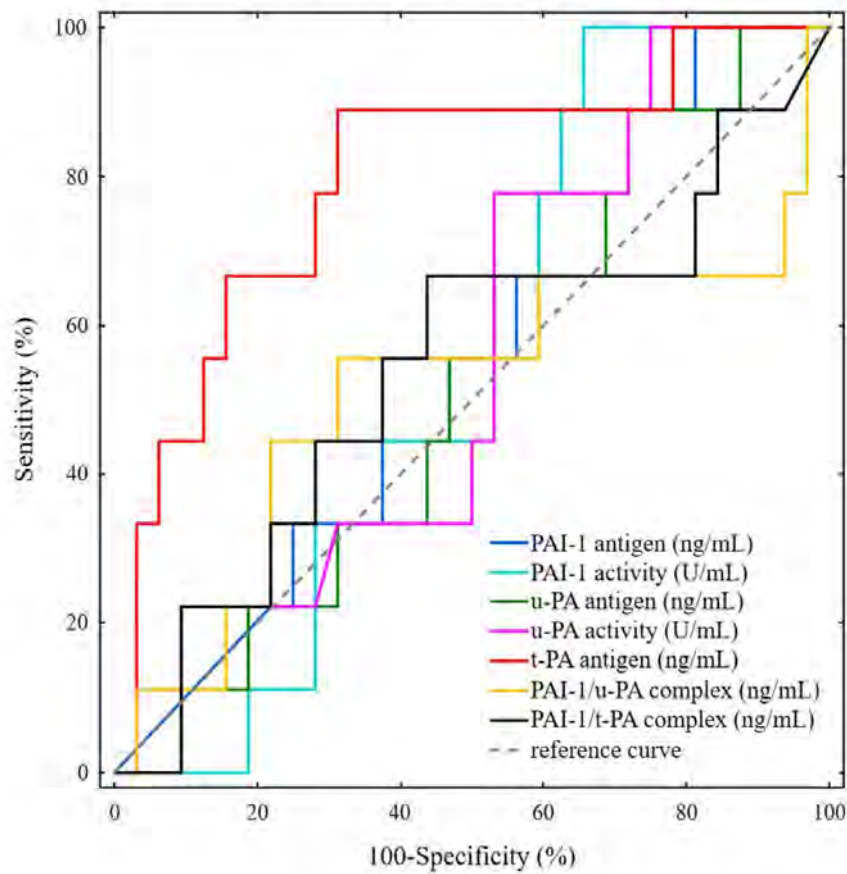


Figure 1. ROC curve analysis of the investigated fibrinolytic biomarkers.

**Table 4.** Results of predictive accuracy for individual fibrinolytic parameters.

| ROC Data                      | Stimulant      | Stimulant     | Destimulant   | Destimulant  | Destimulant   | Destimulant        | Stimulant          |
|-------------------------------|----------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------------|--------------------|
|                               | PAI-1 Activity | PAI-1 Antigen | t-PA Antigen  | u-PA Antigen | u-PA Activity | PAI-1/u-PA Complex | PAI-1/t-PA Complex |
| AUC                           | 0.552          | 0.566         | 0.799         | 0.521        | 0.557         | 0.510              | 0.542              |
| Youden index                  | 0.34           | 0.26          | 0.58          | 0.17         | 0.25          | 0.24               | 0.23               |
| Cut-off point                 | 3.04           | 35.12         | 1.37          | 0.74         | 1.30          | 1.93               | 0.89               |
| Sensitivity (%)               | 100            | 88.9          | 88.9          | 88.9         | 100           | 55.6               | 66.7               |
| Specificity (%)               | 34.4           | 37.5          | 65.6          | 28.1         | 25.0          | 68.8               | 56.3               |
| Positive predictive value (%) | 30.0           | 28.6          | 42.1          | 25.8         | 27.3          | 33.3               | 30.0               |
| Negative predictive value (%) | 100.0          | 92.3          | 95.5          | 90.0         | 100.0         | 84.6               | 85.7               |
| Accuracy (%)                  | 48.8           | 48.8          | 70.7          | 41.5         | 41.5          | 65.9               | 58.5               |
| <i>p</i> -value               | 0.5695         | 0.5044        | <b>0.0006</b> | 0.8369       | 0.5706        | 0.9350             | 0.7210             |

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1; t-PA: tissue plasminogen activator; u-PA: urokinase plasminogen activator; bold *p*-values denote significant differences.

**3.4. Survival Analysis Regarding Fibrinolytic Parameters**

All patients in this study received regular follow-up for 59 to 68 months (the median follow-up was 66 months). Overall, five patients (12.2%) died during the follow-up period due to systemic metastatic disease, and four (9.8%) cases developed relapse expressed by distant metastases. The calculated median and ROC cut-off point values of investigated fibrinolytic parameters were used to divide patients into two groups: the group with a baseline below the cut-off point and the group with a baseline above the cut-off value (Table 5). By applying the log-rank test, differences in the survival functions were observed only in the following variables: PAI-1 activity divided according to the ROC cut-off and t-PA antigen divided according to both cut-offs.

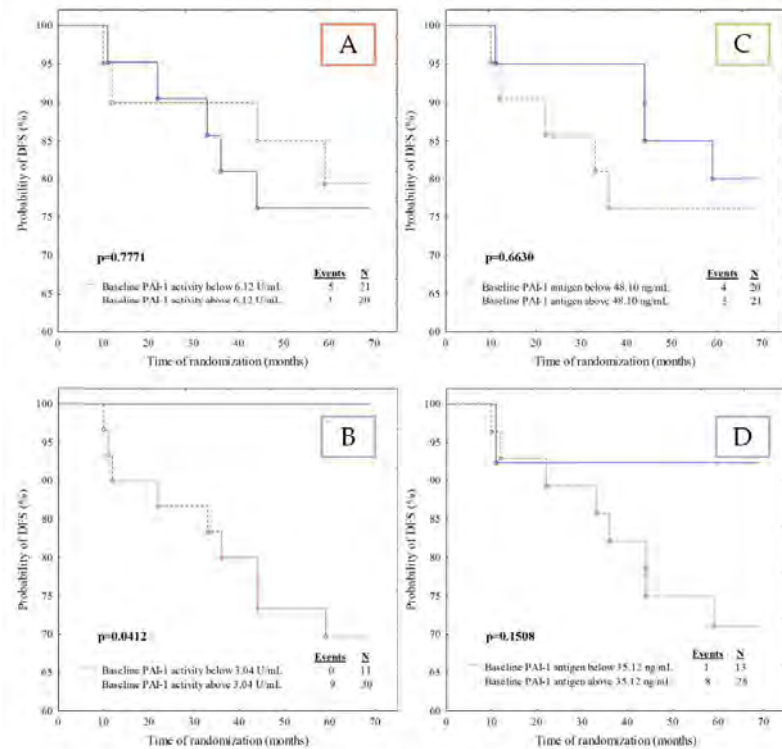
**Table 5.** Calculated median and ROC cut-off point values of investigated fibrinolytic parameters.

|                    | PAI-1 Activity [U/mL] | PAI-1 Antigen [ng/mL] | t-PA Antigen [ng/mL] | u-PA Activity [U/mL] | u-PA Antigen [ng/mL] | PAI-1/u-PA Complex [ng/mL] | PAI-1/t-PA Complex [ng/mL] |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Medians            | 6.12                  | 48.10                 | 1.41                 | 0.86                 | 0.41                 | 2.65                       | 0.82                       |
| ROC cut-off points | 3.04                  | 35.12                 | 1.37                 | 1.30                 | 0.74                 | 1.93                       | 0.89                       |

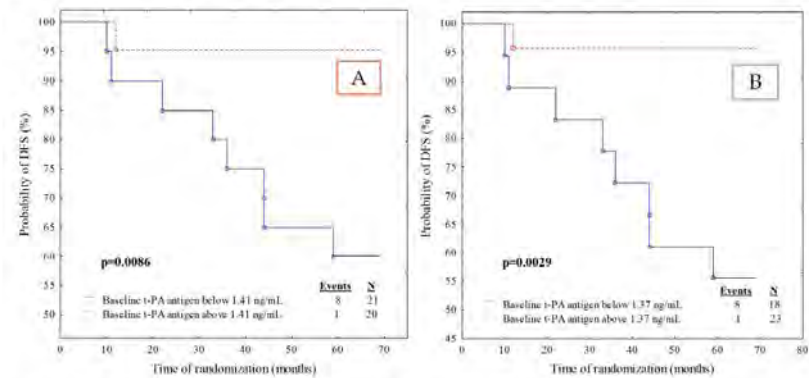
PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1; t-PA: tissue plasminogen activator; u-PA: urokinase plasminogen activator.

Patients with PAI-1 activity below 3.04 U/mL had significantly better DFS than those with PAI-1 activity above 3.04 U/mL (*p* = 0.0412), as shown in Figure 2B. Eleven patients (26.8%) demonstrated PAI-1 activity below 3.04 U/mL, whereas 30 patients (73.2%) had PAI-1 activity above 3.04 U/mL. Recurrence of the disease in the group of patients with PAI-1 activity below the cut-off point occurred in none of the 11 cases (0%), but in the group with PAI-1 activity above the cut-off point, 9 out of 30 (30%) patients had a recurrence of the disease.

According to Kaplan–Meier analysis for t-PA antigen with a cut-off point based on the median value, we observed that the survival rate was worse in patients with t-PA antigen below the cut-off point than in patients with t-PA antigen above the cut-off point. Twenty-one out of the 41 (51.2%) cases had t-PA antigen lower than 1.41 ng/mL; the recurrence rate for those subjects was 38.1% versus 5.0% for those with higher levels of t-PA antigen (Figure 3A). Similar results were also obtained for the t-PA antigen (Figure 3B) with the cut-off point based on the ROC cut-off point (*p* = 0.0029).



**Figure 2.** Kaplan–Meier curves for the disease-free survival (DFS) analysis of the studied population regarding (A) PAI-1 activity divided according to median cut-off; (B) PAI-1 activity divided according to ROC cut-off; (C) PAI-1 antigen divided according to median value cut-off; (D) PAI-1 antigen divided according to ROC cut-off.

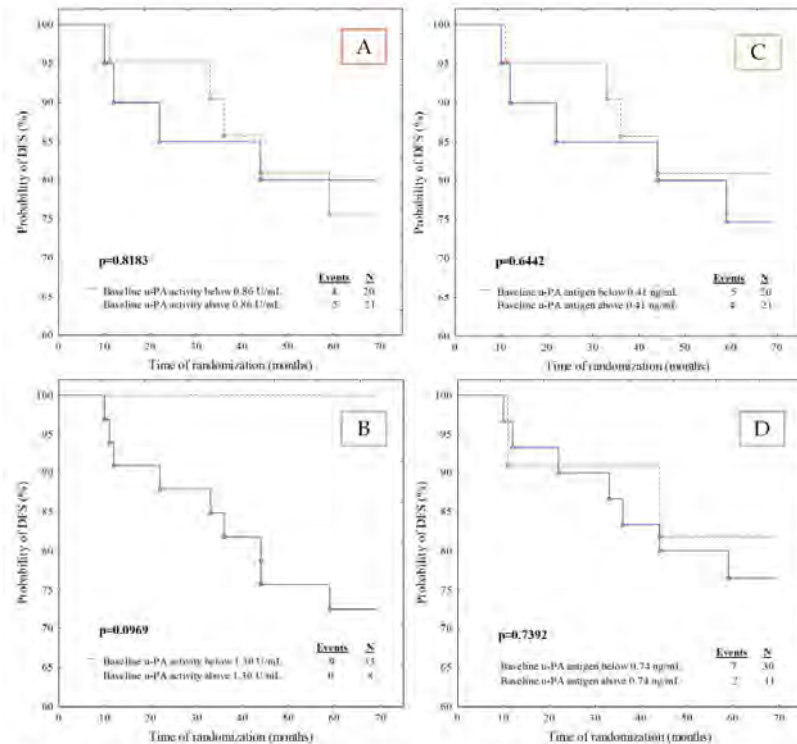


**Figure 3.** Kaplan–Meier curves for the disease-free survival (DFS) analysis of the studied population regarding (A) t-PA antigen divided according to median value cut-off; (B) t-PA antigen divided according to ROC cut-off.



Based on Kaplan–Meier survival analysis, we postulate that higher PAI-1 activity or lower t-PA antigen concentration significantly correlates with an increased risk of breast cancer recurrence.

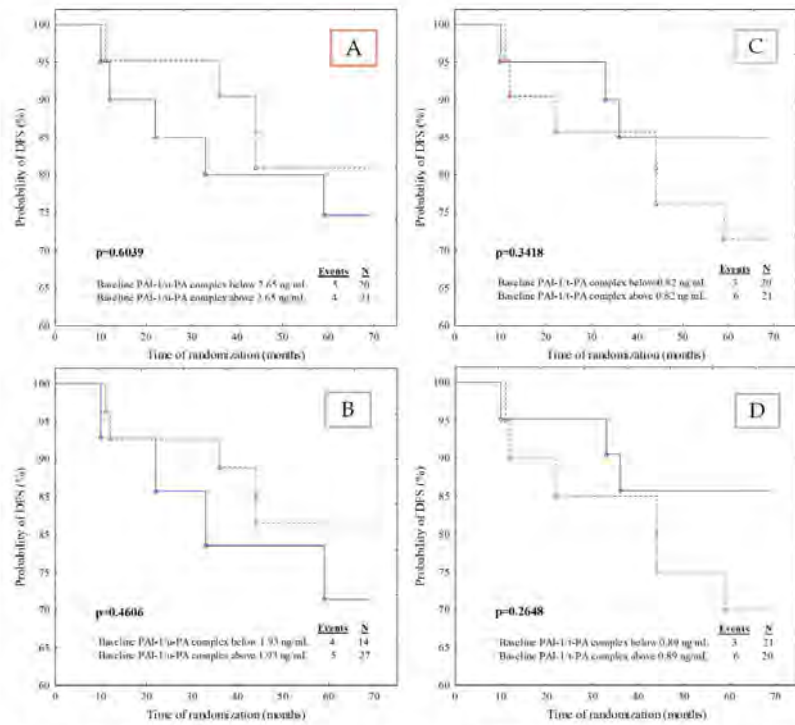
The remaining analysed parameters did not show any predictive value in our cohort (Figures 4A–D and 5A–D). Nevertheless, the Kaplan–Meier analysis revealed an essential growing tendency towards a higher risk of disease relapse in patients with u-PA activity lower than 1.30 U/mL ( $p = 0.0969$ ).



**Figure 4.** Kaplan–Meier curves for the disease-free survival (DFS) analysis of the studied population regarding (A) u-PA activity divided according to median value cut-off; (B) u-PA activity divided according to ROC cut-off; (C) u-PA antigen divided according to median value cut-off; (D) u-PA antigen divided according to ROC cut-off.

### 3.5. Potential Associations of the Disease-Free Survival with Fibrinolytic Parameters

A univariate logistic regression analysis was used to predict the risk of developing breast cancer recurrence as contributed by the fibrinolytic profile. Table 6 shows the odds ratio (OR) of recurrent breast cancer according to fibrinolytic parameters. It was found that only t-PA antigen significantly contributed to the disease-free survival. An increase of 1 ng/mL in t-PA antigen level was found to reduce the risk of breast cancer relapse by 0.06 (OR) (95% CI = 0.01 to 0.68;  $p = 0.0209$ ).



**Figure 5.** Kaplan–Meier curves for the disease-free survival (DFS) analysis of the studied population regarding (A) PAI-1/u-PA complex divided according to median value cut-off; (B) PAI-1/u-PA complex divided according to ROC cut-off; (C) PAI-1/t-PA complex divided according to median value cut-off; (D) PAI-1/t-PA complex divided according to ROC cut-off.

**Table 6.** Logistic regression analysis of disease-free survival predictors in breast cancer patients.

| Variable           | Code                         | Disease-Free Survival |               |
|--------------------|------------------------------|-----------------------|---------------|
|                    |                              | OR (95% CI)           | p-Value       |
| PAI-1 antigen      | <48.10 ng/mL<br>≥48.10 ng/mL | 1.25 (0.28–5.53)      | 0.7685        |
| PAI-1 activity     | <6.12 U/mL<br>≥6.12 U/mL     | 0.80 (0.18–3.54)      | 0.7685        |
| u-PA antigen       | <0.41 ng/mL<br>≥0.41 ng/mL   | 0.71 (0.16–3.12)      | 0.6461        |
| u-PA activity      | <0.86 U/mL<br>≥0.86 U/mL     | 1.25 (0.28–5.53)      | 0.7685        |
| t-PA antigen       | <1.41 ng/mL<br>≥1.41 ng/mL   | 0.06 (0.01–0.68)      | <b>0.0209</b> |
| PAI-1/u-PA complex | <2.65 ng/mL<br>≥2.65 ng/mL   | 0.71 (0.16–3.12)      | 0.6461        |
| PAI-1/t-PA complex | <0.82 ng/mL<br>≥0.82 ng/mL   | 2.27 (0.48–10.69)     | 0.3008        |

OR; odds ratio; CI: confidence interval; significant differences are denoted by bold p-values.



3.6. Analysis of Fibrinolytic Parameters as Prognostic Markers Using Univariate and Multivariate Cox Proportional Hazards Regression Models

In this study, we also used a univariate and multivariate Cox regression to analyse the prognostic factors of disease-free survival, which took into account the function of time. The multivariate Cox regression model was adjusted for prognostic factors including BMI, age at the time of diagnosis, smoking status, staging system, intrinsic type, histological type, nodal involvement and tumour diameter (Table 7). Thus, in a multivariate analysis, by including fibrinolytic parameters in a model with all the traditional predictive factors, we found no significant association of fibrinolytic parameter levels with the risk of breast cancer relapse ( $p > 0.05$ ). However, the univariate Cox regression model showed that t-PA antigen was significantly associated with a prolonged DFS (HR = 0.10, 95% CI = 0.01–0.83,  $p = 0.0323$ ). According to these results, patients with a t-PA antigen higher than 1.41 ng/mL appear to have a 90% decreased risk of breast cancer recurrence.

Table 7. The multivariate and univariate Cox regression models for disease-free survival.

| Variables          | Multivariate  |          | Univariate  |               |
|--------------------|---------------|----------|-------------|---------------|
|                    | HR (95% CI)   | p-Values | HR (95% CI) | p-Values      |
| PAI-1 antigen      |               |          |             |               |
| Low                | 4.41          | 0.0768   | 1.34        | 0.6652        |
| High               | (0.85–22.85)  |          | (0.36–4.99) |               |
| PAI-1 activity     |               |          |             |               |
| Low                | 8.42          | 0.1497   | 0.83        | 0.7784        |
| High               | (0.46–152.83) |          | (0.22–3.08) |               |
| u-PA antigen       |               |          |             |               |
| Low                | 0.73          | 0.7551   | 0.74        | 0.6468        |
| High               | (0.10–5.36)   |          | (0.20–2.74) |               |
| u-PA activity      |               |          |             |               |
| Low                | 0.64          | 0.6849   | 1.17        | 0.8192        |
| High               | (0.08–5.46)   |          | (0.31–4.34) |               |
| t-PA antigen       |               |          |             |               |
| Low                | 0.15          | 0.1199   | 0.10        | <b>0.0323</b> |
| High               | (0.01–1.64)   |          | (0.01–0.83) |               |
| PAI-1/u-PA complex |               |          |             |               |
| Low                | 0.12          | 0.0839   | 0.71        | 0.6065        |
| High               | (0.01–1.34)   |          | (0.19–2.64) |               |
| PAI-1/t-PA complex |               |          |             |               |
| Low                | 0.87          | 0.8812   | 1.93        | 0.3527        |
| High               | (0.15–5.24)   |          | (0.48–7.72) |               |

Cox proportional hazards model was used for unadjusted univariate and adjusted multivariate analyses-BMI, age at the time of diagnosis, smoking status, staging, intrinsic type, histological type, nodal involvement and tumour diameter; significant differences are denoted by bold p-values.

3.7. Association of Fibrinolytic Parameters with Disease-Free Survival in Linear Regression Models

The associations of fibrinolytic parameter levels and disease-free survival by multiple linear regression analyses are shown in Table 8. Breast cancer recurrence was negatively associated only with t-PA antigen concentration using multivariate linear regression analyses after adjusting for age, BMI, parity, menopausal status and smoking status. In model 1 adjusted for age, the results showed that a lower t-PA antigen level was correlated with a higher risk of breast cancer relapse (standardized Beta =  $-0.4197$ ;  $p = 0.0071$ ). Similarly, in models 2 and 3, the results showed that a lower t-PA antigen level was associated with a higher risk of relapse occurrence after adjusting for age, BMI, parity, menopausal status

and smoking status (standardized Beta = -0.3788;  $p = 0.0213$  for model 2 and standardized Beta = -0.3815;  $p = 0.0227$  for model 3, respectively). After adjusting for age, BMI, parity, menopausal status, smoking status, tumour stage, tumour diameters, intrinsic type, histological type, and nodal involvement (model 4), we found no significant trend for breast cancer relapse and t-PA antigen concentration ( $p > 0.05$ ).

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

|                    |                 | Model 1       | Model 2       | Model 3       | Model 4 |
|--------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| PAI-1 antigen      | Beta            | 0.0914        | 0.1434        | 0.1468        | 0.2002  |
|                    | <i>p</i> -value | 0.5758        | 0.3886        | 0.3865        | 0.1832  |
| PAI-1 activity     | Beta            | -0.0930       | -0.0116       | -0.0094       | 0.3033  |
|                    | <i>p</i> -value | 0.5941        | 0.9556        | 0.9651        | 0.1133  |
| u-PA antigen       | Beta            | -0.1048       | -0.0259       | -0.0204       | -0.0499 |
|                    | <i>p</i> -value | 0.6066        | 0.9793        | 0.9093        | 0.7539  |
| u-PA activity      | Beta            | -0.1041       | -0.1306       | -0.1386       | -0.1739 |
|                    | <i>p</i> -value | 0.5458        | 0.4624        | 0.4430        | 0.2721  |
| t-PA antigen       | Beta            | -0.4197       | -0.3788       | -0.3815       | -0.1996 |
|                    | <i>p</i> -value | <b>0.0071</b> | <b>0.0213</b> | <b>0.0227</b> | 0.2039  |
| PAI-1/u-PA complex | Beta            | 0.0925        | 0.1224        | 0.1136        | 0.0939  |
|                    | <i>p</i> -value | 0.5700        | 0.4590        | 0.5064        | 0.5611  |
| PAI-1/t-PA complex | Beta            | 0.0160        | 0.0931        | 0.0836        | 0.1960  |
|                    | <i>p</i> -value | 0.9228        | 0.5985        | 0.6471        | 0.2081  |

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, tumour stage, tumour diameters, intrinsic type, histological type, nodal involvement. Significant differences are denoted by bold *p*-values.

#### 4. Discussion

Breast cancer is the most common malignant neoplasm and the leading cause of cancer death in women worldwide. Despite tremendous medical advances, the overall survival of patients with breast cancer has only slightly improved due to the vast heterogeneity of this neoplasm from the clinical, histopathological and molecular standpoints. Therefore, a new tactic and strategy should be adopted for a personalized approach to breast cancer patients. Such a new approach obliges contemporary medicine to search for effective predictive biomarkers that could be easily applied in everyday clinical practice. In recent years, the fibrinolytic parameters have been shown to play a significant role in the pathogenesis of several cancers as the main factors capable of initiating local recurrence and metastasis to other organs; thus, we hypothesize that parameters of the fibrinolytic profile, especially t-PA antigen, may have a significant role in breast cancer development and progression [1,10].

Biomarkers of the fibrinolytic system are essential factors in the haemostatic system involved in the dissolution of blood clots. In addition to their fundamental role in fibrin disintegration, the parameters of the fibrinolytic proteins also participate in many different pathophysiological processes. The leading cause of mortality from breast cancer is the development of metastasis to distant organs. Many factors play a crucial role in cancer dissemination, but vascular endothelial dysfunction is the fundamental cause of metastatic transmigration of cells. The endothelium produces most of the proteins involved in haemostasis processes, including tissue factor (TF), thrombomodulin, t-PA, u-PA or PAI-1. The proteolytic properties of the fibrinolytic proteins affect the fibrin dissolution and lead to the disintegration and degradation of the main components of the vascular endothelial basement membrane, which in turn promotes the neoplastic cell migration. The latest reports indicate that abnormalities of the coagulation and fibrinolysis processes are linked with neoplastic disease and indirectly lead to tumour progression and development. In the light of new data, t-PA is required for promotion of tumour growth, angiogenesis and its invasive phenotype [18–23].

We decided to estimate the prognostic value of plasma selected fibrinolytic factors in patients with early-stage breast cancer. This study indicated that t-PA antigen may serve as an independent biomarker for the risk of disease recurrence or dissemination in early-stage breast cancer. We established that plasma levels of t-PA antigen lower than 1.41 ng/mL were associated with a poorer prognosis and shorter DFS. Several other statistical analyses confirmed this observation. According to the ROC curve and the AUC value, we showed that t-PA antigen is the strongest predictor of disease relapse among all investigated fibrinolytic markers (AUC = 0.799;  $p < 0.0006$ ). Based on the Youden index, we pointed out that the cut-off point of 1.37 ng/mL of t-PA antigen may serve as a value that discriminates between disease recurrence patients and those without disease relapse, with a specificity of 65.6% and sensitivity of 88.9%. Using the multivariate Cox regression model and logistic regression analysis, it was ultimately found that a low baseline concentration of t-PA correlated with poorer disease-free survival. The lower level of t-PA antigen was associated with a more enhanced risk of breast cancer progression. It can be assumed that patients with a baseline higher t-PA concentration (>1.41 ng/mL) are 90% less prone to develop breast cancer recurrence than patients with a lower baseline t-PA concentration. Thus, we speculate that the downregulation of t-PA concentration is associated with worse outcomes in breast cancer patients. Our current research provides strong power and evidence because it has been confirmed by using advanced statistical methods including Kaplan–Meier survival analysis or Cox regression, logistic regression, and multivariate linear regression. Similar results have been obtained by Corte et al., who proved the negative relationship between the expression of t-PA in breast carcinoma tissue and prognosis. According to them, lower t-PA levels in breast cancer patients are associated with a shortened relapse-free and overall survival. The authors take advantage of two facts: t-PA is an oestrogen-inducible enzyme, and the presence of oestrogen receptors (ER) is generally correlated with a good outcome. They hypothesize that the concentration of t-PA may directly reflect ER's individual and biological activity [24].

Despite this fact, we would like to refer to the current results of our previous study [18]. Surprisingly, we obtained completely opposite results in an earlier investigation since a higher concentration of t-PA was linked with a more aggressive tumour character and a higher possibility of breast cancer dissemination. Additionally, a marked tendency toward a higher concentration of t-PA in T2, stage IIA+IIB, and lymph node-involved tumours was noted. Divergent results may be caused by different sizes of the study population, cut-off points or differences in the reagent kits used for measurement that were manufactured by other companies. Therefore, establishing adequate methodology and cut-off points for fibrinolytic factors are relevant to reaching a consensus. Costanzo et al. also revealed results inconsistent with those of our current study, since the authors reported that an elevated concentration of plasma t-PA antigen is a positive and independent biomarker of breast cancer risk. The authors suggested that a higher concentration of t-PA may lead to the development of metastasis due to proteolytic degradation of the extracellular matrix. Under these conditions, t-PA acts as a molecular mediator of angiogenesis. The plasminogen activator/plasmin system, due to enzymatic cascade, is involved in the conversion of plasminogen to plasmin. Plasmin then degrades the main components of the vascular endothelial basement membrane and activates matrix metalloproteinases that degrade the extracellular matrix, allowing cancer cells to migrate, invade and spread to distant sites. Moreover, Costanzo et al. imply that t-PA is a potent inductor of cell proliferation, including breast cancer cells [25]. Similar results have been presented in the study performed by Chernicky et al. The authors proved that low levels of t-PA are correlated with a good prognosis and more extended disease-free survival periods. This study explains that breast cancer cells express the insulin-like growth factor receptor and respond to insulin-like growth factor (IGF) in the environment. Based on this fact, Chernicky et al. revealed that IGF plays a role in upregulating t-PA levels that may contribute to breast cancer's aggressive behaviour. Moreover, the authors showed that high u-PA levels indicated a poor prognosis in a breast cancer patient, which was not confirmed in our study [26]. However,

the expression or concentration of fibrinolytic parameters may differ between various tissues and cancer types, and those discrepancies warrant further studies in this regard. Despite the continual advancement of knowledge, a consensus on this point has still not been reached.

Several studies indicate that u-PA concentration is a more accurate diagnostic and prognostic biomarker than t-PA [17,27]. Additionally, there is evidence that cancer invasion and metastasis mainly depend on u-PA and its receptor activity [28]. However, such observation is inconsistent with our results. Since applying numerous advanced statistical tests apart from Kaplan–Meier analysis, the results regarding u-PA antigen and activity did not differ significantly. The Kaplan–Meier analysis revealed an essential growing tendency towards a higher risk of disease relapse in patients with lower activity of u-PA than 1.3 U/mL ( $p = 0.0969$ ). This observation identified a similar trend of u-PA activity as the t-PA antigen. Most likely, the lack of statistical difference may be due to the small size of the study group. The study also indicated that patients with early-stage breast cancer more frequently demonstrate lower u-PA activity (33 cases (80%) with lower vs. 8 (20%) with higher u-PA activity than 1.30 U/mL).

The blood was collected in standard conditions to limit the impact of circadian lability of fibrinolytic parameters. Nevertheless, shift work, work at night, or chronic jet lag may impact the main fibrinolytic agents' circadian secretion. Interestingly, circadian haemostatic factor expression may promote the hypercoagulability phenotype by elevating PAI-1 and reducing t-PA [29]. Surprisingly, in our investigation, the concentration of PAI-1 antigen was significantly lower in breast cancer patients with lymph node involvement than in tumour-free lymph node patients. Moreover, according to the molecular classification, the subgroup of luminal-A breast cancer patients displayed PAI-1 activity more than twice as high as that in other-molecular-types cases. However, it is worth noting that patients with PAI-1 activity below 3.04 U/mL had a significantly better DFS. Despite this inconsistency, our current and previous studies suggest that PAI-1 may predict disease relapse; thus, PAI-1 expression presents prognostic and predictive value in breast cancer patients [18]. Interestingly, no fibrinolytic markers other than PAI-1 activity and antigen showed potential association with tumour diameter, TNM classification, histological grade, oestrogen receptor expression, progesterone receptor expression and Ki67 activity. This may suggest that none of these other factors significantly influenced the fibrinolytic parameter profile. Despite our findings, many authors provided strong evidence that u-PA, PAI-1 and u-PA/PAI-1 are vital factors for tumour invasion and metastases in breast cancer [27,28]. Lampelj et al. established that high levels of both proteolytic enzymes u-PA and PAI-1 are related to poor prognosis in patients with breast cancer [30]. Further, Harbeck et al. confirmed these observations [31]. The authors explain that u-PA plays a significant role in proteolytic degradation of the extracellular matrix, enabling the development of metastases. Furthermore, PAI-1 has a crucial and paradoxical role in cancer-promoting angiogenesis and tumour cell survival. Despite that, PAI-1 is an inhibitor of u-PA in the plasminogen activator system, and theoretically, PAI-1 should be anticipated to have an anti-tumorigenic function; surprisingly, PAI-1 mediates in adhesion, migration, invasion, proliferation and apoptosis of normal and malignant cells through its anti-protease and vitronectin-binding functions and cancer cell apoptosis inhibition as well [30,32]. Based on these contrary results, further research is needed. These discrepancies seem surprising, but it is worth noting that there are considerable differences in the collection of the biological samples used to measure t-PA. Some of the available studies assessing the predictive value of the fibrinolytic parameters in breast cancer focus on the measurement of these biomarkers' expression only in the neoplastic tumour environment. The material for research in most available sources was mainly neoplastic tissue (tumour) [24], while in this study, the concentrations of fibrinolytic parameters were assessed only in plasma. In addition, the use of adjuvant therapy could have impacted the fibrinolytic parameters [10].



### Limitations of the Study

There are some limitations to our study. First, we included a small number of patients, which could constitute a bias; data should be confirmed in a more extensive and prospective series of patients. Although we collected and adjusted data for probable confounders in our study, there could be unmeasured and undefined factors with possible residual effects. We evaluated patients in single-centre designed research. Further prospective studies with more significant patient numbers and longer follow-ups are required to investigate the long-term outcome. Sufficient evidence has not yet been accumulated to determine cut-off values of the t-PA, u-PA, PAI-1 or PAI-1/t-PA and PAI-1/uPA complexes for early-stage IBrC; thus, further evaluation should be performed.

### 5. Conclusions

Despite the small cohort size, we suggest that a higher plasma t-PA was linked with a good prognosis and that t-PA antigen demonstrates substantial predictive value since this observation was confirmed by the application of several advanced statistical tests. Additionally, lower PAI-1 activity was associated with better outcomes in breast cancer patients. We hypothesize that in those cases with a higher t-PA level or lower PAI-1 activity, it is a possible enhancement of the fibrinolysis process, which is associated with better prognosis. Nevertheless, that hypothesis should be confirmed in a larger, adequately powered study.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.R.-C., A.S., K.W.; methodology, B.R.-C., A.S., E.Z.; software, K.W.; validation, K.W., B.R.-C., E.Z.; formal analysis, K.W.; investigation, K.W., B.R.-C.; resources, B.R.-C., P.R.; data curation, B.R.-C.; writing—original draft, K.W., B.R.-C., A.S.; writing—review and editing, B.R.-C.; visualization, K.W., E.Z.; 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 following 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 patients for participating in our study. Many thanks to the biomedical laboratory scientists Barbara Góralczyk and Małgorzata Michalska for their contributions in sample preparation and laboratory assistance.

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

### References

1. World. Global Cancer Observatory; International Agency for Research on Cancer; World Health Organization. 2020. Available online: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf> (accessed on 24 November 2021).
2. Breast Cancer: Statistics. Available online: <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/statistics> (accessed on 24 November 2021).
3. Feng, Y.; Spezia, M.; Huang, S.; Yuan, C.; Zeng, Z.; Zhang, L.; Ji, X.; Liu, W.; Huang, B.; Luo, W.; et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* **2018**, *5*, 77–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lal, I.; Dittus, K.; Holmes, C.E. Platelets, coagulation and fibrinolysis in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, 207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lima, L.G.; Monteiro, R.Q. Activation of blood coagulation in cancer: Implications for tumour progression. *Biosci. Rep.* **2013**, *33*, e00064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Batschauer, A.P.B.; Figueiredo, C.P.; Bueno, E.C.; Ribeiro, M.A.; Dusse, L.M.S.; Fernandes, A.P.; Gomes, K.B.; Carvalho, M.G. D-dimer as a possible prognostic marker of operable hormone receptor-negative breast cancer. *Ann. Oncol.* **2010**, *21*, 1267–1272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Tas, F.; Kilic, L.; Duranyildiz, D. Coagulation tests show significant differences in patients with breast cancer. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 5985–5992. [CrossRef] [PubMed]
8. Chavez-MacGregor, M.; Zhao, H.; Kroll, M.; Fang, S.; Zhang, N.; Hortobagyi, G.N.; Buchholz, T.A.; Shih, Y.C.; Giordano, S.H. Risk factors and incidence of thromboembolic events (TEEs) in older men and women with breast cancer. *Ann. Oncol.* **2011**, *22*, 2394–2402. [CrossRef] [PubMed]
9. Decensi, A.; Maisonneuve, P.; Rotmensz, N.; Bettega, D.; Costa, A.; Sacchini, V.; Salvioni, A.; Travaglini, R.; Oliviero, P.; D’Aiuto, G.; et al. Italian Tamoxifen Study Group. Effect of tamoxifen on venous thromboembolic events in a breast cancer prevention trial. *Circulation* **2005**, *111*, 650–656. [CrossRef] [PubMed]
10. Mahmood, N.; Rabbani, S.A. Fibrinolytic system and cancer: Diagnostic and therapeutic applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4358. [CrossRef]
11. Zarychta, E.; Rhone, P.; Bielawski, K.; Rosc, D.; Szot, K.; Zdunska, M.; Ruskowska-Ciastek, B. 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*, 921–931. [CrossRef]
12. Rhone, P.; Zarychta, E.; Bielawski, K.; Ruskowska-Ciastek, B. Pre-surgical level of von Willebrand factor as an evident indicator of breast cancer recurrence. *Cancer Biomark.* **2020**, *29*, 359–372. [CrossRef] [PubMed]
13. Yigit, E.; Gönüllü, G.; Yücel, I.; Turgut, M.; Erdem, D.; Cakar, B. Relation between hemostatic parameters and prognostic/predictive factors in breast cancer. *Eur. J. Intern. Med.* **2008**, *19*, 602–607. [CrossRef]
14. Tinholt, M.; Stavik, B.; Tekpli, X.; Garred, Ø.; Borgen, E.; Kristensen, V.; Sahlberg, K.K.; Sandset, P.M.; Iversen, N. Coagulation factor V is a marker of tumor-infiltrating immune cells in breast cancer. *Oncotimmunology* **2020**, *9*, 1824644. [CrossRef]
15. Rhone, P.; Ruskowska-Ciastek, B.; Bielawski, K.; Brkic, A.; Zarychta, E.; Góralczyk, B.; Roszkowski, K.; Rośc, D. Comprehensive analysis of haemostatic profile depending on clinicopathological determinants in breast cancer patients. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20171657. [CrossRef]
16. Mandoj, C.; Pizzuti, L.; Sergi, D.; Sperduti, I.; Mazzotta, M.; Di Lauro, L.; Amodio, A.; Carpano, S.; Di Benedetto, A.; Botti, C.; et al. Observational study of coagulation activation in early breast cancer: Development of a prognostic model based on data from the real world setting. *J. Transl. Med.* **2018**, *16*, 129. [CrossRef] [PubMed]
17. Look, M.P.; van Putten, W.L.; Duffy, M.J.; Harbeck, N.; Christensen, I.J.; Thomssen, C.; Kates, R.; Spyrtos, F.; Fernö, M.; Eppenberger-Castori, S.; et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 116–128. [CrossRef] [PubMed]
18. 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*, 1146–1156. [CrossRef] [PubMed]
19. Ortiz-Zapater, E.; Peiró, S.; Roda, O.; Corominas, J.M.; Aguilar, S.; Ampurdanés, C.; Real, F.X.; Navarro, P. Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. *Am. J. Pathol.* **2007**, *170*, 1573–1584. [CrossRef] [PubMed]
20. Suzuki, Y.; Yasui, H.; Brzoska, T.; Mogami, H.; Urano, T. Surface-retained tPA is essential for effective fibrinolysis on vascular endothelial cells. *Blood* **2011**, *118*, 3182–3185. [CrossRef] [PubMed]
21. McMahon, B.; Kwaan, H.C. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **2008**, *36*, 184–194. [CrossRef] [PubMed]
22. Teliga-Czajkowska, J.; Sienko, J.; Jalinik, K.; Smolarezyk, R.; Czajkowski, K. Prognostic value of tissue plasminogen activator (tPA) in patients with epithelial ovarian cancer undergoing chemotherapy. *Ginekol. Pol.* **2019**, *90*, 235–241. [CrossRef] [PubMed]
23. Kumari, S.; Malla, R. New insight on the role of plasminogen receptor in cancer progression. *Cancer Growth Metastasis* **2015**, *8*, 5–42. [CrossRef] [PubMed]
24. Corte, M.D.; Vérez, P.; Rodriguez, J.C.; Roibás, A.; Dominguez, M.L.; Lamelas, M.L.; Vázquez, J.; García Muñoz, J.L.; Allende, M.T.; González, L.O.; 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. [CrossRef] [PubMed]
25. Costanzo, S.; Parisi, R.; De Curtis, A.; Gamba, S.; Russo, L.; Persichillo, M.; Panzera, T.; Marchetti, M.; Cerletti, C.; de Gaetano, G.; et al. Tissue plasminogen activator levels and risk of breast cancer in a case-cohort study on Italian Women: Results from the Molisani Study. *Thromb. Haemost.* **2021**, *121*, 449–456. [CrossRef] [PubMed]
26. Chernicky, C.L.; Yi, L.; Tan, H.; Ilan, J. Tissue-type plasminogen activator is upregulated in metastatic breast cancer cells exposed to insulin-like growth factor—I. *Clin. Breast Cancer* **2005**, *6*, 340–348. [CrossRef] [PubMed]
27. Duffy, M.J.; McGowan, P.M.; Harbeck, N.; Thomssen, 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. [CrossRef] [PubMed]
28. Mahmood, N.; Mihalicioiu, C.; Rabbani, S.A. Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): Diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 24. [CrossRef]
29. Carmona, P.; Mendez, N.; Ili, C.G.; Brebi, P. The Role of clock genes in fibrinolysis regulation: Circadian disturbance and its effect on fibrinolytic activity. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 129. [CrossRef] [PubMed]
30. Lampelj, M.; Arko, D.; Cas-Sikosek, N.; Kavalar, R.; Ravnik, M.; Jezersek-Novakovic, B.; Dobnik, S.; Dovnik, N.F.; Takac, I. Urokinase plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in breast cancer-correlation with traditional prognostic factors. *Radiol. Oncol.* **2015**, *49*, 357–364. [CrossRef] [PubMed]

31. Harbeck, N.; Schmitt, M.; Meisner, C.; Friedel, C.; Untch, M.; Schmidt, M.; Sweep, C.G.J.; Lisboa, B.W.; Lux, M.P.; Beck, T.; et al. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur. J. Cancer* **2013**, *49*, 1825–1835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Placencio, V.R.; DeClerck, Y.A. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer: Rationale and insight for future therapeutic testing. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2969–2974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## **Wprowadzenie do badania opublikowanego w pracy nr 2:**

**Wrzeszcz K**, Rhone P, Kwiatkowska K, Ruszkowska-Ciastek B. Hypercoagulability state combined with post-treatment hypofibrinolysis in invasive breast cancer: a seven-year follow-up evaluating disease-free and overall survival. *Life*. 2023; 13(5): 1106. [IF: 3,2; MNiSW: 70 pkt.]

Leczenie raka piersi ma charakter wielodyscyplinarny, a główne czynniki determinujące decyzję o terapii zależą od stopnia zaawansowania i biologii nowotworu. Spersonalizowany plan leczenia raka piersi obecnie nadal opiera się na tradycyjnych czynnikach prognostycznych i predykcyjnych, w tym klinicznych, histologicznych i niektórych dobrze zdefiniowanych czynnikach biologicznych, takich jak receptory ER, PR oraz HER2. Pomimo skuteczności współczesnych terapii przeciwnowotworowych, istnieją znaczące potencjalne skutki uboczne wynikające z ich zastosowania. Szczególną obawę budzi fakt, że wielokrotne terapie przeciwnowotworowe wiążą się ze zwiększonym ryzykiem zakrzepicy.

Hemostaza jest podstawowym procesem w utrzymaniu krążenia, obejmującym złożoną, wysoce zrównoważoną interakcję pomiędzy naczyniami krwionośnymi, płytkami krwi, osocзовymi czynnikami krzepnięcia i białkami fibrynolitycznymi. Brak równowagi pomiędzy procesem krzepnięcia a procesem fibrynolizy inicjuje i sprzyja zakrzepicy, która jest jedną z głównych przyczyn zgonów z powodu nowotworów. Jednym z kluczowych czynników przyczyniających się do rozwoju zaburzeń hemostazy w nowotworach jest związana z komórkami nowotworowymi promocja skrzepu, polegająca na wytwarzaniu przez komórki nowotworowe czynników prokoagulacyjnych. Spośród nich, czynnik tkankowy, ulegający nadekspresji na powierzchni komórek złośliwych, może odgrywać kluczową rolę w krzepnięciu wywołanym procesem nowotworzenia, powodując aktywację kaskady krzepnięcia. Wysoka ekspresja TF w tkance nowotworowej pacjentów chorych na raka została powiązana z progresją nowotworu, gorszymi wynikami klinicznymi i zakrzepicą. Inne główne szlaki zakrzepicy związanej z nowotworem obejmują ekspresję w komórkach nowotworowych białek fibrynolizy - aktywatora plazminogenu typu urokinazy (u-PA), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) oraz inhibitora aktywacji plazminogenu 1 (PAI-1).

Dodatkowe mechanizmy aktywacji krzepnięcia krwi w przebiegu choroby nowotworowej uruchamiane są przez leki przeciwnowotworowe. Leki przeciwnowotworowe



mogą wywoływać działanie trombogeniczne poprzez wiele różnych mechanizmów. Bezpośrednie uszkodzenie komórek śródbłonna przez środki przeciwnowotworowe, prowadzące do nadekspresji TF i utraty właściwości przeciwzakrzepowych, wydaje się być najważniejszą przyczyną zakrzepicy związanej z terapią nowotworów. Choć obecne leczenie przeciwnowotworowe jest skuteczną i niezawodną metodą leczenia wielu rodzajów nowotworów, u pacjentów otrzymujących terapię uzupełniającą występuje zwiększone ryzyko zakrzepicy, niezależnie od nowotworu. Co zaskakujące, ta interakcja w przypadku wczesnego inwazyjnego raka piersi nie została w pełni oceniona.

**W publikacji numer 2** siedmioletnim, prospektywnym badaniem objęto 60 pacjentek z pierwotnym, inwazyjnym rakiem piersi z medianą wieku 56 lat (IQR 51–59 lat). W okresie obserwacji z medianą wynoszącą 71 miesięcy, progresję choroby stwierdzono u 11 pacjentek, w tym dwa nawroty o charakterze miejscowym lub przerzutowym (częstość nawrotów 18,33%) oraz dziewięć zgonów wynikających z ogólnoustrojowej choroby przerzutowej (wskaźnik śmiertelności 15%).

W momencie rozpoznania 14 (23%) nie przeszło menopauzy przed rozpoczęciem badań, a 46 (77%) pacjentek znajdowało się w okresie pomenopauzalnym. Oceniona średnica guzów wahała się od 0,4 do 3,5 cm, z medianą wielkości 1,55 cm (IQR 1,2–2,3 cm). Na podstawie klasyfikacji molekularnej najczęstszym podtypem w tym badaniu był typ luminalny A (57% pacjentek), podczas gdy u 26 (43%) pacjentek występowały guzy inne niż w podtypie luminalnym A, w tym luminalne B, Nieluminalne HER2+ i potrójnie ujemne. U 85% pacjentek występował inwazyjny rak przewodowy, a u 15% inwazyjny rak zrazikowy.

W ramach badań oceniono aktywność i stężenie czynnika tkankowego (TF), inhibitora szlaku czynnika tkankowego (TFPI), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) oraz inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1). Do oceny parametrów hemostatycznych osocza wykorzystano komercyjne testy immunoenzymatyczne (ELISA). Próbkę krwi od pacjentek pobrano dwukrotnie - 24 godziny przed planowaną operacją oraz 8 miesięcy po operacji usunięcia guza. W tym okresie pacjentki zostały poddane uzupełniającej terapii przeciwnowotworowej.

Celem pracy była ocena wpływu leczenia uzupełniającego na stężenie i aktywność czynników układu hemostazy, w tym TF, TFPI, t-PA oraz PAI-1 u pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi. Dodatkowo przeprowadzono ocenę dokładności diagnostycznej i potwierdzono

przydatność badanych parametrów hemostatycznych w przewidywaniu ryzyka nawrotu choroby nowotworowej.

Zebrane dane kliniczno-terapeutyczne poddano analizie statystycznej. Zastosowano nieparametryczne testy, w tym test Wilcozona, test U Manna-Whitneya oraz test ANOVA, Dodatkowo przeprowadzone zostały zaawansowane analizy z użyciem krzywej ROC, estymatora przeżycia Kaplana-Meiera oraz regresji Coxa.

**W drugiej publikacji** obszernie przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że skojarzona terapia uzupełniająca znacząco zwiększyła osoczowe stężenie TF i PAI-1, a także aktywność TF i TFPI, ale istotnie obniżyła stężenie t-PA. Ponadto odnotowano, że stosowanie radioterapii, chemioterapii lub hormonoterapii jako jedynej formy leczenia uzupełniającego (monoterapii) nie prowadzi do statystycznie istotnych różnic pomiędzy wyjściowym i pooperacyjnym poziomem biomarkerów hemostatycznych. Jedynym wyjątkiem jest stężenie PAI-1, w przypadku którego zaobserwowano znaczny wzrost stężenia w odpowiedzi na monoterapię. Jednakże wdrożenie terapii skojarzonej, będącej połączeniem różnych form leczenia uzupełniającego, znacząco wpływa na zmiany stężeń i aktywności niemal wszystkich badanych biomarkerów w ogólnej kohorcie pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi. Dodatkowo, przy pomocy krzywej ROC zidentyfikowano, że przedoperacyjna aktywność TF z wartością odcięcia 13,32 U/ml ( $AUC = 0,701$ ,  $p = 0,0143$ ) oraz przedoperacyjne stężenie PAI-1 z wartością odcięcia 36,46 ng/ml ( $AUC = 0,659$ ,  $p = 0,0472$ ) stanowią najsilniejsze predyktory nawrotu choroby nowotworowej i mogą skutecznie przewidywać ryzyko wznowy jeszcze przed zastosowaniem terapii uzupełniającej. W aspekcie porównania poszczególnych biomarkerów po leczeniu, najlepszym czynnikiem prognostycznym wznowy raka po leczeniu adjuwantowym okazał się t-PA, którego stężenie na poziomie 3,13 ng/ml ze swoistością 59,2% i czułością 90,9% może w sposób wiarygodny przewidzieć efekty leczenia chorych na raka piersi.

Krzywe Kaplana-Meiera wykazały, że wysokie stężenie TF i PAI-1 przed leczeniem oraz wysoka aktywność TF przed leczeniem odpowiada istotnie krótszemu czasowi przeżycia wolnego od choroby. Podobnie, przedoperacyjny wysoki poziom TF oraz PAI-1 skorelowany jest ze znacząco krótszym czasem przeżycia całkowitego. Z kolei badanie krzywych Kaplana-Meiera dla poziomów biomarkerów hemostatycznych po leczeniu wykazało, że pacjentki z wyższym stężeniem antygenu t-PA po leczeniu charakteryzowały się gorszym rokowaniem w zakresie przeżycia wolnego od choroby oraz przeżycia całkowitego.

Uzyskane wyniki zostały poparte regresją Coxa, która wykazała, że aktywność TF przed leczeniem  $> 13,32$  U/ml oraz stężenie PAI-1 przed leczeniem  $> 36,46$  ng/ml są dodatnio skorelowane ze zwiększonym ryzykiem nawrotów raka piersi (odpowiednio HR = 14,33, 95% CI = 1,81–113,28,  $p = 0,0116$ ; HR = 8,39, 95% CI = 1,07–65,58,  $p = 0,0427$ ). Jednocześnie jednoczynnikowa analiza biomarkerów hemostatycznych po leczeniu sugeruje, że u pacjentek ze stężeniem t-PA powyżej 3,13 ng/ml po leczeniu ryzyko nawrotu choroby jest 11,29-krotnie większe (HR = 11,29, 95% CI = 1,43–89,25,  $p = 0,0216$ ).

**Z badania wynika, że terapia uzupełniająca istotnie zwiększa osoczowe stężenie TF i PAI-1 oraz aktywność TF i TFPI, jednocześnie znacząco obniża stężenie t-PA. Biorąc pod uwagę rolę biomarkerów hemostatycznych oraz nasilony wpływ leczenia przeciwnowotworowego na stan nadkrzepliwości i hipofibrynolizy, można sugerować, że u chorych na raka piersi leczonych terapią uzupełniająca istnieje wyższe ryzyko wystąpienia żylnych i tętniczych powikłań zakrzepowo-zatorowych. Dodatkowo zidentyfikowano, że zarówno aktywność TF przed leczeniem, jak i stężenie PAI-1, a także stężenie t-PA po leczeniu są powiązane z przyszłymi wynikami związanymi z przeżyciem pacjentek. Wyższa przedoperacyjna aktywność TF i stężenie PAI-1 oraz wyższe stężenie t-PA po leczeniu istotnie zwiększają prawdopodobieństwo nawrotu raka piersi i śmierci spowodowanej chorobą przerzutową.**

Article

# Hypercoagulability State Combined with Post-Treatment Hypofibrinolysis in Invasive Breast Cancer: A Seven-Year Follow-Up Evaluating Disease-Free and Overall Survival

Katarzyna Wrzeszcz <sup>1,\*</sup>, Piotr Rhone <sup>2</sup>, Katarzyna Kwiatkowska <sup>1</sup> and Barbara Ruszkowska-Ciastek <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum, 85-094 Bydgoszcz, Poland; katarzynakwiatkowska@abs.umk.pl

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

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

**Abstract:** (1) Background: Cancer treatment, including chemotherapy, endocrine therapy, targeted therapy and radiotherapy, has been identified as an important independent risk factor for venous thromboembolism in cancer patients. The aim of the study was to evaluate the effect of adjuvant therapy on the coagulation and fibrinolysis components in invasive breast cancer. (2) Methods: Tissue factor pathway inhibitor (TFPI), tissue factor (TF), tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) antigen (concentration) and TFPI and TF activities were examined in the blood samples of 60 breast cancer patients treated by adjuvant chemotherapy, endocrine therapy, radiotherapy and immunotherapy. Blood samples were taken 24 h before primary surgery and 8 months after tumour removal surgery. (3) Results: Adjuvant therapy administered to breast cancer patients significantly increased the concentration of plasma TF, the PAI-1 antigen and also the activity of TFPI and TF, but significantly decreased the level of the t-PA antigen. Combined chemotherapy and endocrine therapy, but not monotherapy, has an important effect on haemostatic biomarker levels. (4) Conclusions: Breast cancer patients receiving adjuvant therapy have an elevated risk of developing a hypercoagulability and hypofibrinolysis state leading to venous thromboembolism.

**Keywords:** breast cancer; adjuvant treatment; hemostasis; cancer therapy-associated thrombosis



Citation: Wrzeszcz, K.; Rhone, P.; Kwiatkowska, K.; Ruszkowska-Ciastek, B. Hypercoagulability State Combined with Post-Treatment Hypofibrinolysis in Invasive Breast Cancer: A Seven-Year Follow-Up Evaluating Disease-Free and Overall Survival. *Life* **2023**, *13*, 1106. <https://doi.org/10.3390/life13051106>

Academic Editor: Dimitar Avtanski

Received: 29 March 2023

Revised: 24 April 2023

Accepted: 25 April 2023

Published: 28 April 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

Breast cancer treatment is multidisciplinary, and the main factors determining the therapy decision-making depend on the stage and biology of the tumour [1,2]. The individualised plan for the clinical management of breast cancer currently still relies on traditional prognostic and predictive factors, including clinical, histological and some well-defined biological factors such as hormone receptors: ER (oestrogen receptor), PR (progesterone receptor) and HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) expression [3]. Adjuvant therapy, given in addition to primary surgery, plays a critical role in the treatment of early-stage breast cancer. It may consist of local treatment (radiotherapy) and systemic treatments (chemotherapy, endocrine and biological therapies). Recent advances in therapeutic patterns have developed more precise delivery of adjuvant treatment with an improvement in survival rates by reducing the risk of local and distant recurrence [4]. Despite the effectiveness of contemporary anticancer therapies, there are significant potential adverse effects. Of particular concern, multiple cancer therapies are associated with an increased risk of thrombosis [5]. Cancer treatments, including chemotherapy, endocrine therapy, targeted therapy and radiotherapy, have been identified as an important independent risk factor for VTE (venous thromboembolism) in cancer patients [6].

Haemostasis is a fundamental process in the maintenance of circulation, involving an intricate, highly balanced interaction between blood vessels, platelets, plasma coagulation

factors and fibrinolytic proteins in the formation and dissolution of blood clots [7,8]. Imbalance between coagulation and the fibrinolysis process initiates and promotes thrombosis, which is one of the leading causes of death in cancer [9]. The pathomechanism of blood coagulation and fibrinolysis activation in cancer is complex and multifactorial and its exact pathophysiological pathways are still under elucidation [10]. There are multiple pathophysiological processes involved in the interplay between cancer and various components of the haemostatic system [11]. One of the key factors contributing to the development of haemostatic disorders in cancer is the tumour-cell-associated clot promotion consisting of the production of procoagulant factors by tumour cells [10]. Of these, tissue factor (TF) overexpressed on the malignant cell surface can play a crucial role in cancer-induced coagulation, resulting in clotting cascade activation. A high TF expression in the tumour tissue of cancer patients has been correlated with tumour progression, worse clinical outcomes and thrombosis [12]. Other principal pathways of cancer-associated thrombosis include the tumour-cell expression of fibrinolysis proteins—urokinase-type plasminogen activator (u-PA), tissue-type plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activation inhibitor-1 (PAI-1)—and cytokines interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). As the fibrinolytic factors are primarily involved in the breakdown of fibrin, u-PA and t-PA, their proteolytic properties also enable the activation of metalloproteinases resulting in disintegration and degradation of the extracellular matrix, which in turn promotes neoplastic cell migration and tumour invasion. The potential interaction of tumour-overexpressed inflammatory cytokines with the haemostatic system involves thrombogenicity promotion and fibrinolysis inhibition through inducing TF and PAI-1 expression by endothelial cells [13,14].

Additional mechanisms of blood-clotting activation in the course of cancer are triggered by the antineoplastic medications. Anticancer drugs are capable of inducing thrombogenic effects through multiple different mechanisms: (1) release of procoagulants and proinflammatory cytokines from damaged neoplasm cells; (2) direct drug toxicity on the vascular endothelium; (3) direct induction of monocyte or tumour-cell expression of TF; (4) a decrease in physiological anticoagulants; and (5) platelet activation and aggregation. The direct injury of endothelial cells by anticancer agents leading to TF overexpression and a loss of antithrombotic properties appears to be the most important cause of cancer therapy-associated thrombosis. Though current anticancer treatment is an effective and reliable way to treat many types of cancer, patients receiving adjuvant therapy are at an elevated risk of thrombosis and recurrent events independent of their neoplasm. Several cytotoxic chemotherapeutic agents, as well as endocrine therapy, radiotherapy and targeted therapy, have demonstrated side-effects on the haemostasis process [13,15,16].

Even though there is a plethora of encouraging clinical evidence on the potential impact of anticancer therapy on haemostatic parameters studied in different kinds of cancers, surprisingly this interaction in the early stage of invasive breast cancer (IBrC) has been not fully evaluated. In this seven-year prospective, single-institution study, the components of procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic system were investigated before and after the administration of adjuvant treatment to assess the effects of the potential impact of adjuvant therapy on future clinical outcomes with respect to disturbance of the haemostatic balance in women with breast cancer.

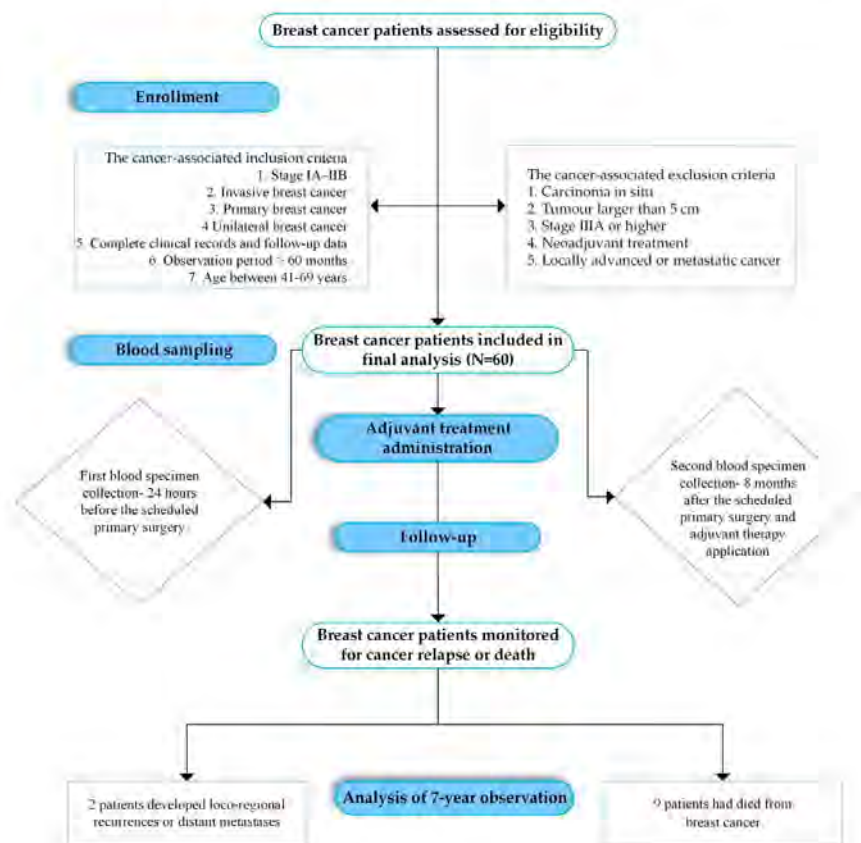
## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Participants and Design

A total of 60 primary IBrC patients diagnosed between November 2015 and June 2017 at the Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre in Bydgoszcz, Poland were eligible for this study. Clinical information was obtained from medical records based on interviews conducted by an oncologist with expertise in breast cancer. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the Nicolaus Copernicus University in Toruń at Collegium Medicum im. Ludwik Rydygier in Bydgoszcz (reference number: KB/547/2015). Clinical data were collected in accordance



with the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2000. Patients' written informed consent to the use of their data and biological material was sought prior to enrolling in the study. Traditional methods for breast cancer diagnosis, including histological and clinical factors and molecular marker analysis, were provided by the Pathology Department of Oncology Centre. The tumour tissues were analysed and histologically classified according to the World Health Organisation, graded using the Elston and Ellis grading system and grouped into stages according to TNM classification according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC; 7th ed.). Intrinsic subtypes of breast cancer were established by applying immunohistochemical marker profiles. The study protocol and the key inclusion and exclusion criteria of patients who were eligible for the research are presented in Figure 1.



**Figure 1.** Flowchart of the study.

## 2.2. Treatment Plan and Therapeutic Procedures

All breast cancer subjects included in the study underwent surgery as a primary treatment, including mastectomy, breast-conserving surgery (BCS) or modified radical mastectomy (MRM). None of the patients had received any treatment before the surgical operation. The primary surgery was followed by postoperative adjuvant treatment, consisting of radiotherapy, brachytherapy, hormone therapy, chemotherapy or immunotherapy based on the tumour profile. The frequency of application of the particular therapies is

presented in Table 1. Post-surgery radiotherapy was used as a standard therapeutic option in the postoperative setting mainly in patients after BCS. The radiation was delivered with 6/15 MV X-ray given in 17–20 fractions over 4–6 weeks. Total doses ranged from 42.5 to 50 gray (Gy). High dose rate (HDR) brachytherapy as a boost treatment with an internal beam to the tumour bed was administrated with a single fraction of 10 Gy. Twenty-seven women were treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy and four received non-anthracycline regimens according to standard protocols indicating from three to six cycles. Oestrogen-receptor (ER)-positive patients were submitted to endocrine therapy with tamoxifen (Egis Pharmaceuticals, Budapest, Hungary), aromatase inhibitors (AIs) (Arimidex (anastrozole), AstraZeneca, Cambridge, UK) or a combination of tamoxifen and AIs. One ER-positive patient did not receive endocrine therapy due to a small tumour diameter. The type of endocrine treatment depended on menopausal status. Almost all patients with HER2 amplification received targeted immunotherapy (Trastuzumab). All IBrc patients enrolled in this study completed their entire recommended treatment regimen.

**Table 1.** Presentation of IBrc patients according to demographic and clinical characteristics.

| Demographic and Clinical Variables         | Overall (n = 60; 100%) |
|--|------------------------|
| Age  |                        |
| <56 years                                  | 27 (45%)               |
| ≥56 years                                  | 33 (55%)               |
| Menopausal status                          |                        |
| pre-menopause                              | 14 (23%)               |
| post-menopause                             | 46 (77%)               |
| Body mass index                            |                        |
| Normal ≤ 24.99 kg/m <sup>2</sup>           | 30 (50%)               |
| Overweight or obese ≥ 25 kg/m <sup>2</sup> | 30 (50%)               |
| Parity status                              |                        |
| 0  | 6 (10%)                |
| 1–2  | 41 (68%)               |
| 3 and more                                 | 13 (22%)               |
| Smoking status                             |                        |
| Smokers                                    | 17 (28%)               |
| Non-smokers                                | 43 (72%)               |
| Tumour localization                        |                        |
| Left breast                                | 31 (52%)               |
| Right breast                               | 29 (48%)               |
| Histological type                          |                        |
| IDC  | 51 (85%)               |
| ILC  | 9 (15%)                |
| Histological grade                         |                        |
| G1 + G2                                    | 47 (78%)               |
| G3   | 13 (22%)               |
| cT category (7th ed.)                      |                        |
| T1   | 37 (59%)               |
| T2   | 23 (41%)               |
| cN category (7th ed.)                      |                        |
| N0   | 42 (68%)               |
| N1   | 18 (32%)               |
| cStage (7th ed.)                           |                        |
| IA   | 24 (39%)               |
| IIA + IIB                                  | 36 (61%)               |

Table 1. Cont.

| Demographic and Clinical Variables | Overall (n = 60; 100%) |
|------------------------------------|------------------------|
| Molecular subtype                  |                        |
| Luminal A                          | 34 (57%)               |
| Non-luminal A                      | 26 (43%)               |
| Molecular components               |                        |
| ER (+)                             | 51 (85%)               |
| ER (−)                             | 9 (15%)                |
| PR (+)                             | 45 (75%)               |
| PR (−)                             | 15 (25%)               |
| HER2 (+)                           | 8 (13%)                |
| HER2 (−)                           | 52 (87%)               |
| Proliferation marker expression    |                        |
| Ki67 < 20%                         | 39 (65%)               |
| Ki67 ≥ 20%                         | 21 (35%)               |
| Surgery type                       |                        |
| Mastectomy                         | 5 (8%)                 |
| BCS                                | 46 (77%)               |
| MRM                                | 9 (15%)                |
| Radiotherapy                       |                        |
| Yes                                | 49 (82%)               |
| No                                 | 11 (18%)               |
| Brachytherapy                      |                        |
| Yes                                | 28 (47%)               |
| No                                 | 32 (53%)               |
| Chemotherapy                       |                        |
| Anthracycline                      | 27 (45%)               |
| Non-anthracycline                  | 4 (7%)                 |
| No                                 | 29 (48%)               |
| Endocrine therapy                  |                        |
| Tamoxifen                          | 30 (50%)               |
| Inhibitor aromatase                | 13 (22%)               |
| Tamoxifen + inhibitor aromatase    | 7 (11%)                |
| No                                 | 10 (17%)               |
| Immunotherapy                      |                        |
| Yes                                | 6 (10%)                |
| No                                 | 54 (90%)               |

IDC: Invasive ductal carcinoma; ILC: Invasive lobular carcinoma; G1: low grade; G2: intermediate grade; G3: high grade; T1: tumour diameter ≤ 2 cm; T2: tumour diameter > 2 cm to ≤ 5 cm; N0: lack of lymph node metastases; N1: spread to axillary lymph nodes; ER: oestrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; Ki67: proliferation marker; BCS: breast-conserving surgery; MRM: modified radical mastectomy.

### 2.3. Clinical Outcomes and Survival Data

The follow-up period was counted from the date of IBrc diagnosis to the last date of contact. The duration from study enrolment to the date of relapse was determined as the duration of disease-free survival (DFS), and the duration until the patient was last seen or had died was determined as the overall survival time (OS). During the median follow-up period of 71 months (interquartile range: 68.5–74.5 months), 11 patients presented with disease progression including two locoregional recurrences or distant metastases (recurrence rate 18.33%) and nine deaths (death rate 15%).

### 2.4. Laboratory Assays

#### 2.4.1. Blood Sampling

Blood samples for testing TF, TFPI, t-PA, PAI-1 antigen (concentrations) and TF, TFPI activities were collected from each enrolled patient twice according to standard procedures.



The first blood specimen collection took place 24 h before the scheduled primary surgery. The second blood collection occurred 8 months after tumour removal surgery. During the period between the first and second blood collections, all patients underwent adjuvant anticancer therapy. Peripheral blood from patients was drawn into sterile cooled tubes (Becton Dickinson Vacutainer R System, Plymouth, UK) containing 0.13 mol/L trisodium citrate (final blood to anticoagulant ratio 9:1). The plasma was separated by centrifugation for 15 min at  $3000\times g$  at  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and kept at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until assayed but for no longer than 6 months.

#### 2.4.2. Haemostatic Parameters

To evaluate the plasma haemostatic parameters concentrations, we used the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ELISA analyses were performed using commercial ELISA kits. The concentrations of TFPI, TF and PAI-1 were defined using the IMUBIND<sup>®</sup>Tissue Factor, IMUBIND<sup>®</sup>TFPI and IMUBIND<sup>®</sup>Plasma PAI-1 ELISA test Kit 96-Well Plate Assay, Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, CT, USA, respectively. The concentration of t-PA was measured using the AssayMax<sup>™</sup> Human t-PA ELISA Kit, Assaypro LLC, St. Charles, MO, USA. The plasma activities of TF and TFPI were assayed with chromogenic assays, the ACTICHROME<sup>®</sup>TF and ACTICHROME<sup>®</sup>TFPI-tests (Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, CT, USA), respectively.

#### 2.4.3. Immunohistochemistry Staining

The ER and PR status, expression of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and Ki67-proliferation index were measured in specimens of breast tumour tissue by immunohistochemistry methods. ER and PR status were quantitatively evaluated using the VENTANA BenchMark system (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) with anti-ER clone SP1 and anti-PR clone 1E2 as the primary antibodies. Tumours were considered as positive for ER and PR if more than 1% of tumour nuclei were stained independently of staining intensity in accordance with the recommendations of the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. HER2 immunostaining was performed using VENTANA anti-HER2/neu (4B5) antibodies. The intensity of the HER2 expression was scored as HER2-negative = 0 or 1+ and HER2-positive = 3+. Tumours with scores of 2+ were taken as equivocal cases, which were further recommended for fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis. The Ki67 antigen staining was performed using the monoclonal mouse antibody (Auto-stainer Link 48, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The Ki67 score was calculated as the percentage of immunostained cells. The optimal cut-off for a high versus low Ki67 score was defined as the 20% threshold.

#### 2.5. Statistical and Bioinformatics Analysis

The collected data were analysed using Statistica v. 13.1 (StatSoft, Cracow, Poland). The normality distribution of the data set was tested by the Shapiro-Wilk test. Median and interquartile ranges (IQR) were calculated for descriptive non-parametric data. The Wilcoxon pair rank test was used to compare the observed differences in post-treatment haemostatic parameter levels with respect to pre-treatment values. The significance of differences in plasma haemostatic parameter levels between the subgroups was determined by the Mann-Whitney U test or ANOVA test. The receiver-operating characteristics (ROC) curves were plotted to evaluate the diagnostic accuracies of the studied haemostatic parameters for the prediction of DFS in IBrC patients. The diagnostic accuracy of each biomarker was expressed as the area under curve (AUC). The DFS and OS analyses were described by Kaplan–Meier curves and compared between groups with log-rank tests. The Kaplan–Meier curves were designed using MedCalc software. The hazard ratios (HR) for potential prognostic factors of IBrC recurrence were determined by univariate and multivariate Cox proportional hazard regression with 95% confidence intervals. The level of significance was considered as  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Characteristics of Invasive Breast Cancer Patients

The basic demographic and descriptive characteristic of this study cohort are shown in Table 1. The median age of the patients was 56 years (IQR 51–59 years). At the time of diagnosis, 14 (23%) patients were premenopausal whereas 46 (77%) were postmenopausal. The median BMI was 25.0 kg/m<sup>2</sup> (IQR 22.4–28.9 kg/m<sup>2</sup>). Half of the patients (50%) were in the BMI ≤ 24.9 kg/m<sup>2</sup> group. The others were classified as overweight (BMI 25–29.9 kg/m<sup>2</sup>) or obese (BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>). Tumour sizes ranged from 0.4 to 3.5 cm, with a median size of 1.55 cm (IQR 1.2–2.3 cm). Regarding histological type, 85% of subjects had invasive ductal carcinoma and 15% had invasive lobular carcinoma. The majority of the analysed group were patients in stage IIA/IIB (61%) according to the TNM staging system. The remaining patients (39%) were in stage IA. The ER (+), PR (+) and HER2 (+) were determined for 85%, 75% and 13% of the cases, respectively. Based on molecular classification, the luminal A type was the most common subtype in this study (57% of the patients) whereas 26 (43%) patients had non-luminal A tumours, including luminal B, non-luminal HER2+ and triple-negative.

#### 3.2. Clinical Presentation of Patients Regarding to Haemostatic Parameters

The detailed analysis of variabilities in the antigen (concentration) and activity of haemostatic parameters with respect to demographic and clinicopathological characteristics are presented in Tables S1 and S2 (see the Supplementary Materials for further details). It was found that most of the demographic features (age, menopausal status, BMI, parity status and smoking status), histopathological (histological grade and histological type) and clinical characteristics (TNM classification, molecular subtype and Ki67 expression) had no significant impact on the baseline and post-treatment TFPI, TF, t-PA, PAI-1 antigen levels and TFPI, TF activities. However, we noticed a tendency toward a higher pre-treatment TFPI activity in patients with tumour localised in the left breast; higher post-treatment TFPI activity in patients with grade G3, stage N1 and Ki67 ≥ 20%; higher pre-treatment TFPI antigen in patients ≥ 56 years with BMI ≥ 25 kg/m<sup>2</sup>; higher pre-treatment TF activity in patients with non-luminal A cancer subtype and Ki67 ≥ 20%; higher post-treatment t-PA antigen in patients with invasive ductal carcinoma; higher pre-treatment PAI-1 activity in patients with tumour localised in the left breast, invasive ductal carcinoma and post-treatment PAI-1 activity in patients with BMI ≥ 25 kg/m<sup>2</sup> ( $p < 0.05$ ).

#### 3.3. The Impact of Adjuvant Treatment on the TFPI, TF, t-PA, PAI-1 Antigen Concentrations and TFPI, TF Activities

In the present study, we examined the potential impact of anticancer treatment on the TE, TFPI, t-PA, PAI-1 antigen concentrations and TE, TFPI activities in breast cancer patients. Baseline levels of the haemostatic parameters were examined according to the response to primary and adjuvant treatment. The primary surgery as well as adjuvant therapy significantly increased the plasma concentration of TE, the PAI-1 antigen and also activity of TE and TFPI but significantly decreased the t-PA antigen concentration, as shown in Tables 2 and 3. However, we found no significant change in the TFPI antigen concentration before or after anticancer treatment.

**Table 2.** TFPI activity, TFPI and TF antigen concentrations according to the type of surgery and adjuvant therapy in IBrc subjects.

| Type of Treatment | Pre-Treatment TFPI Activity [U/mL] | Post-Treatment TFPI Activity [U/mL] | p-Value *     | Pre-Treatment TFPI Antigen [ng/mL] | Post-Treatment TFPI Antigen [ng/mL] | p-Value ** | Pre-Treatment TF Antigen [ng/mL] | Post-Treatment TF Antigen [ng/mL] | p-Value ***       |
|-------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| Surgery type      |                                    |                                     |               |                                    |                                     |            |                                  |                                   |                   |
| Mastectomy        | 1.28                               | 1.68                                | 0.2249        | 61.88                              | 32.87                               | 0.0796     | 466.34                           | 822.71                            | 0.2249            |
|                   | 1.26/1.36                          | 1.56/1.96                           |               | 58.80/64.56                        | 31.94/46.69                         |            | 392.64/577.40                    | 452.43/841.96                     |                   |
|                   | 1.29                               | 1.64                                |               | 43.74                              | 42.57                               |            | 552.70                           | 834.90                            |                   |
| BCS               | 1.12/1.48                          | 1.10/2.06                           | <b>0.0083</b> | 37.12/50.40                        | 38.13/52.48                         | 0.9956     | 400.86/718.70                    | 660.92/999.12                     | <b>&lt;0.0001</b> |
| MRM               | 1.40                               | 1.96                                | <b>0.0284</b> | 40.68                              | 46.53                               | 0.3743     | 592.28                           | 789.20                            | 0.0506            |
|                   | 1.30/1.58                          | 1.72/2.52                           |               | 37.64/55.00                        | 43.23/98.36                         |            | 521.76/896.86                    | 689.43/904.71                     |                   |
| Radiotherapy      |                                    |                                     |               |                                    |                                     |            |                                  |                                   |                   |
| Yes               | 1.28                               | 1.70                                | <b>0.0030</b> | 43.44                              | 42.77                               | 0.8384     | 562.47                           | 831.91                            | <b>&lt;0.0001</b> |
|                   | 1.12/1.48                          | 1.10/2.06                           |               | 37.64/50.80                        | 38.39/51.59                         |            | 400.94/724.55                    | 660.92/999.12                     |                   |
|                   | 1.40                               | 1.72                                |               | 53.92                              | 44.84                               |            | 521.76                           | 822.71                            |                   |
| No                | 1.26/1.58                          | 1.48/2.82                           | 0.0619        | 39.08/61.88                        | 31.94/98.36                         | 0.5937     | 442.73/581.87                    | 655.33/904.71                     | <b>0.0044</b>     |
| Brachytherapy     |                                    |                                     |               |                                    |                                     |            |                                  |                                   |                   |
| Yes               | 1.31                               | 1.54                                | 0.0776        | 42.68                              | 42.69                               | 0.3995     | 537.87                           | 803.05                            | <b>0.0002</b>     |
|                   | 1.12/1.53                          | 1.00/1.92                           |               | 35.82/48.94                        | 38.47/53.11                         |            | 386.85/723.82                    | 666.14/979.33                     |                   |
|                   | 1.31                               | 1.77                                |               | 47.62                              | 43.08                               |            | 557.20                           | 827.41                            |                   |
| No                | 1.15/1.49                          | 1.39/2.20                           | <b>0.0015</b> | 39.88/61.12                        | 34.54/50.30                         | 0.4001     | 439.56/689.41                    | 658.13/1010.72                    | <b>&lt;0.0001</b> |
| Chemotherapy      |                                    |                                     |               |                                    |                                     |            |                                  |                                   |                   |
| Anthracycline     | 1.28                               | 1.82                                | <b>0.0004</b> | 42.36                              | 43.23                               | 0.6139     | 565.46                           | 837.69                            | <b>0.0001</b>     |
|                   | 1.10/1.46                          | 1.40/2.20                           |               | 34.36/61.88                        | 37.87/53.46                         |            | 400.86/726.12                    | 691.40/973.34                     |                   |
|                   | 1.41                               | 2.45                                |               | 40.04                              | 78.01                               |            | 517.51                           | 727.67                            |                   |
| Non-anthracycline | 1.25/1.51                          | 1.57/2.67                           | 0.1441        | 36.24/48.00                        | 53.33/104.68                        | 0.1441     | 413.55/792.09                    | 567.50/1049.22                    | 0.0679            |
| No                | 1.30                               | 1.50                                | 0.2993        | 46.44                              | 41.91                               | 0.2137     | 520.76                           | 789.20                            | <b>0.0001</b>     |
|                   | 1.16/1.56                          | 0.76/1.80                           |               | 40.68/53.92                        | 33.76/46.51                         |            | 402.49/686.50                    | 642.06/1002.68                    |                   |

**Table 2.** Cont.

| Type of Treatment             | Pre-Treatment TFPI Activity [U/mL] | Post-Treatment TFPI Activity [U/mL] | p-Value *     | Pre-Treatment TFPI Antigen [ng/mL] | Post-Treatment TFPI Antigen [ng/mL] | p-Value ** | Pre-Treatment TF Antigen [ng/mL] | Post-Treatment TF Antigen [ng/mL] | p-Value ***       |
|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| Endocrine therapy             |                                    |                                     |               |                                    |                                     |            |                                  |                                   |                   |
| Tamoxifen                     | 1.30                               | 1.48                                | 0.2059        | 45.46                              | 42.22                               | 0.1915     | 572.93                           | 774.18                            | <b>0.0002</b>     |
|                               | 1.14/1.50                          | 0.90/1.82                           |               | 36.04/55.00                        | 33.01/47.86                         |            | 387.68/718.70                    | 642.06/884.08                     |                   |
| Inhibitor aromatase           | 1.26                               | 1.76                                | <b>0.0088</b> | 44.16                              | 46.99                               | 0.1520     | 563.96                           | 890.45                            | <b>0.0046</b>     |
|                               | 1.18/1.32                          | 1.52/2.70                           |               | 40.68/60.36                        | 42.77/105.84                        |            | 466.34/728.94                    | 691.40/973.34                     |                   |
| Tamoxifen+inhibitor aromatase | 1.48                               | 1.96                                | 0.2367        | 55.76                              | 46.51                               | 0.3980     | 562.47                           | 1022.32                           | <b>0.0180</b>     |
|                               | 0.94/1.68                          | 1.74/2.62                           |               | 44.68/63.04                        | 35.44/52.48                         |            | 520.76/774.32                    | 985.32/1267.00                    |                   |
| No                            | 1.38                               | 1.84                                | 0.0745        | 40.50                              | 40.29                               | 0.3329     | 439.56                           | 725.55                            | <b>0.0284</b>     |
|                               | 0.78/1.56                          | 1.10/2.20                           |               | 32.68/43.44                        | 37.87/52.76                         |            | 376.02/474.14                    | 543.86/837.69                     |                   |
| Immunotherapy                 |                                    |                                     |               |                                    |                                     |            |                                  |                                   |                   |
| Yes                           | 1.42                               | 2.17                                | 0.2489        | 42.22                              | 55.21                               | 0.0277     | 481.71                           | 696.06                            | 0.0747            |
|                               | 1.42/1.60                          | 0.76/2.96                           |               | 34.36/58.80                        | 42.61/59.47                         |            | 386.02/718.70                    | 479.66/1002.42                    |                   |
|                               | 1.29                               | 1.69                                |               | 44.58                              | 42.65                               |            | 552.70                           | 827.31                            |                   |
| No                            | 1.12/1.48                          | 1.18/2.06                           | <b>0.0007</b> | 38.00/55.76                        | 35.44/49.00                         | 0.3502     | 431.59/724.55                    | 671.43/985.32                     | <b>&lt;0.0001</b> |

TFPI: Tissue factor pathway inhibitor; TF: Tissue factor; BCS: breast-conserving surgery; MRM: modified radical mastectomy. Data are expressed as median (Me) and the interquartile range (IQR) [lower quartile (Q1)/upper quartile (Q3)]; p-value \* for differences between pre-treatment and post-treatment TFPI activity; p-value \*\* for differences between pre-treatment and post-treatment TFPI antigen; p-value \*\*\* for differences between pre-treatment and post-treatment TF antigen; significant differences are denoted by bold p-values.

**Table 3.** TF activity, t-PA and PAI-1 antigen concentration according to the type of surgery and adjuvant therapy in IBrC subjects.

| Type of Treatment | Pre-Treatment TF Activity [U/mL] | Post-Treatment TF Activity [U/mL] | p-Value *     | Pre-Treatment t-PA Antigen [ng/mL] | Post-Treatment t-PA Antigen [ng/mL] | p-Value **        | Pre-Treatment PAI-1 Antigen [ng/mL] | Post-Treatment PAI-1 Antigen [ng/mL] | p-Value ***       |
|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Surgery type      | 13.70                            | 41.37                             |               | 5.10                               | 2.30                                |                   | 38.52                               | 78.46                                |                   |
| Mastectomy        | 10.61/23.59                      | 12.12/42.63                       | 0.2249        | 4.55/5.87                          | 2.02/3.01                           | 0.0796            | 36.46/58.30                         | 45.47/81.25                          | 0.0796            |
| BCS               | 11.17/23.59                      | 11.22/33.11                       | <b>0.0008</b> | 4.28/6.87                          | 2.05/4.96                           | <b>0.0001</b>     | 27.73/44.97                         | 47.70/85.97                          | <b>&lt;0.0001</b> |
| MRM               | 29.88                            | 32.97                             |               | 6.86                               | 3.28                                |                   | 40.80                               | 73.27                                |                   |
|                   | 11.65/41.82                      | 13.32/45.39                       | 0.3743        | 4.14/7.78                          | 1.98/3.95                           | 0.0858            | 35.50/45.48                         | 60.72/84.65                          | 0.1097            |
| Radiotherapy      | 12.46                            | 20.30                             |               | 5.69                               | 2.93                                |                   | 37.90                               | 79.31                                |                   |
| Yes               | 11.03/23.59                      | 11.20/33.11                       | <b>0.0006</b> | 4.30/7.12                          | 2.02/4.55                           | <b>&lt;0.0001</b> | 27.87/45.48                         | 47.70/85.97                          | <b>&lt;0.0001</b> |
| No                | 23.59                            | 34.09                             |               | 5.87                               | 3.28                                |                   | 37.19                               | 73.27                                |                   |
|                   | 11.65/39.18                      | 123.32/43.56                      | 0.2860        | 3.92/7.16                          | 1.36/6.99                           | 0.0754            | 35.50/44.60                         | 47.83/79.44                          | 0.0912            |
| Brachytherapy     | 12.39                            | 27.84                             |               | 5.83                               | 3.67                                |                   | 36.16                               | 79.85                                |                   |
| Yes               | 11.28/26.40                      | 14.41/33.28                       | <b>0.0067</b> | 4.50/7.43                          | 2.25/5.06                           | <b>0.0083</b>     | 27.52/41.82                         | 48.40/87.42                          | <b>&lt;0.0001</b> |
| No                | 13.65                            | 18.28                             |               | 5.41                               | 2.97                                |                   | 39.50                               | 75.87                                |                   |
|                   | 10.50/27.03                      | 11.24/39.95                       | <b>0.0215</b> | 4.04/7.00                          | 1.63/3.82                           | <b>0.0001</b>     | 31.41/49.71                         | 47.02/81.41                          | <b>0.0004</b>     |
| Chemotherapy      | 13.88                            | 27.69                             |               | 5.87                               | 2.69                                |                   | 37.20                               | 78.15                                |                   |
| Anthracycline     | 11.77/29.88                      | 12.12/33.45                       | 0.0517        | 4.34/6.87                          | 1.79/4.21                           | <b>0.0006</b>     | 27.73/45.48                         | 46.21/84.33                          | <b>&lt;0.0001</b> |
| Non-anthracycline | 27.14                            | 22.74                             |               | 5.19                               | 2.84                                |                   | 39.35                               | 73.93                                |                   |
|                   | 7.89/46.00                       | 13.05/41.14                       | 0.7150        | 3.20/6.06                          | 1.57/7.91                           | 0.7150            | 34.10/126.33                        | 58.95/82.05                          | 0.7150            |
| No                | 11.80                            | 27.13                             |               | 5.69                               | 3.14                                |                   | 37.55                               | 79.31                                |                   |
|                   | 10.39/23.31                      | 11.28/37.68                       | <b>0.0021</b> | 3.99/7.72                          | 2.30/5.02                           | <b>0.0008</b>     | 28.10/44.97                         | 47.70/86.75                          | <b>0.0001</b>     |

**Table 3.** Cont.

| Type of Treatment             | Pre-Treatment TF Activity [U/mL] | Post-Treatment TF Activity [U/mL] | p-Value *     | Pre-Treatment t-PA Antigen [ng/mL] | Post-Treatment t-PA Antigen [ng/mL] | p-Value **        | Pre-Treatment PAI-1 Antigen [ng/mL] | Post-Treatment PAI-1 Antigen [ng/mL] | p-Value ***       |
|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Endocrine therapy             | 11.71                            | 23.72                             |               | 5.59                               | 3.10                                |                   | 35.98                               | 55.30                                |                   |
| Tamoxifen                     | 10.61/23.59                      | 12.12/38.10                       | <b>0.0010</b> | 4.42/6.70                          | 2.02/4.55                           | <b>0.0007</b>     | 28.10/44.60                         | 44.20/81.25                          | <b>0.0002</b>     |
| Inhibitor aromatase           | 23.31                            | 17.10                             |               | 6.44                               | 3.14                                |                   | 37.55                               | 84.18                                |                   |
|                               | 12.31/29.59                      | 11.28/33.45                       | 0.4631        | 4.83/7.72                          | 2.57/6.42                           | <b>0.0024</b>     | 35.12/45.30                         | 79.20/90.08                          | <b>0.0277</b>     |
| Tamoxifen+inhibitor aromatase | 13.70                            | 27.99                             |               | 4.30                               | 6.84                                |                   | 49.60                               | 85.97                                |                   |
|                               | 10.03/23.59                      | 17.91/41.89                       | <b>0.0180</b> | 3.86/6.06                          | 1.18/11.20                          | 0.6121            | 27.30/56.19                         | 81.15/88.22                          | <b>0.0180</b>     |
| No                            | 13.89                            | 26.43                             |               | 5.51                               | 2.12                                |                   | 39.97                               | 73.64                                |                   |
|                               | 12.31/24.17                      | 10.04/30.19                       | 0.7989        | 4.423/7.38                         | 1.16/3.34                           | <b>0.0125</b>     | 30.27/44.46                         | 68.42/82.66                          | <b>0.0069</b>     |
| Immunotherapy                 | 12.61                            | 17.01                             |               | 5.66                               | 2.35                                |                   | 41.12                               | 80.35                                |                   |
| Yes                           | 11.77/15.20                      | 15.65/20.30                       | <b>0.0006</b> | 5.10/6.70                          | 1.79/6.84                           | 0.4631            | 37.90/49.60                         | 49.48/81.43                          | <b>0.0277</b>     |
| No                            | 13.24                            | 27.84                             |               | 5.70                               | 3.14                                |                   | 37.20                               | 78.03                                |                   |
|                               | 11.03/26.92                      | 11.28/37.68                       | 0.3454        | 4.23/7.16                          | 2.05/4.94                           | <b>&lt;0.0001</b> | 28.10/45.30                         | 47.33/85.97                          | <b>&lt;0.0001</b> |

TF: Tissue factor; t-PA: Tissue plasminogen activator; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; Data are expressed as median (Me) and the interquartile range (IQR) [lower quartile (Q1)/upper quartile (Q3)]; p-value \* for differences between pre-treatment and post-treatment TF activity; p-value \*\* for differences between pre-treatment and post-treatment t-PA antigen; p-value \*\*\* for differences between pre-treatment and post-treatment PAI-1 antigen; significant differences are denoted by bold p-values.

Additionally, we compared the pre- and post-treatment concentrations and activities of the studied haemostatic parameters depending on the form of adjuvant treatment applied (Tables 4 and 5). The results showed that treating with radiotherapy, chemotherapy or hormone therapy as the only form of adjuvant treatment (monotherapy) does not lead to statistically significant differences between the baseline and post-treatment haemostatic biomarker levels. The only exception is the PAI-1 antigen, in connection with which we noticed a significant increase in concentration in response to monotherapy. However, the implementation of combination therapy, which is a combination of various forms of adjuvant treatment, significantly affects changes in the concentrations and activities of almost all the investigated biomarkers in the general IBrC cohort. Both therapy combined with chemotherapy and therapy combined with hormone therapy significantly increased the concentrations of plasma TF and the PAI-1 antigen as well as activity of TFPI and TF but significantly decreased the t-PA antigen ( $p < 0.05$ ). These results lead to the initial conclusion that combination adjuvant therapy appears to have a greater impact on the levels of haemostatic parameters than adjuvant therapy when applied as a monotherapy.

#### 3.4. Predictive Value of Haemostatic Parameters for Clinical Outcome

Receiver-operating characteristic (ROC) analysis was performed to examine diagnostic accuracies and confirm the usefulness of the studied haemostatic parameters for the prediction of the DFS (Figure 2). The AUC was estimated to summarise each biomarker's classification accuracy across the cut-off values calculated based on the maximum value of the Youden index (Tables 6 and 7). According to the results, the pre-treatment TF activity (AUC = 0.701,  $p = 0.0143$ ) and PAI-1 (AUC = 0.659,  $p = 0.0472$ ) concentration are considered to be the strongest predictors of disease relapse and may effectively predict breast cancer recurrence before the application of adjuvant therapy. The pre-treatment TF activity of 13.32 U/mL and pre-treatment PAI-1 concentration of 36.46 ng/mL were identified as the best cut-off values to discriminate relapsed from non-relapsed IBrC patients with a sensitivity of both 90.9% and specificity of 61.2%, 49.0%, respectively. Furthermore, comparison of individual post-treatment biomarkers revealed that after adjuvant treatment the t-PA antigen had the highest AUC value (AUC = 0.757,  $p = 0.0001$ ) indicating that a t-PA antigen concentration of 3.13 ng/mL may reliably predict post-treatment outcomes in patients' breast cancer with a specificity of 59.2% and a sensitivity of 90.9%. Despite the fact that the AUC<sup>ROC</sup> for other studied haemostatic parameters were above 0.5, the  $p$ -values were  $>0.05$ , and thus the strong diagnostic potential for predicting future clinical outcome is not achieved.

**Table 4.** TFPI activity, TFPI and TF antigen concentrations according to the type of adjuvant therapy in IBrC patients.

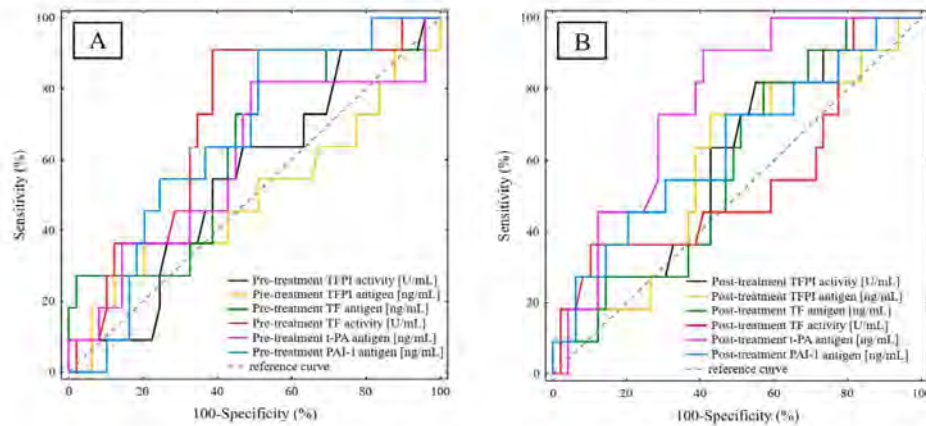
| Type of Adjuvant Therapy                   | Pre-Treatment TFPI Activity [U/mL] | Post-Treatment TFPI Activity [U/mL] | p-Value *     | Pre-Treatment TFPI Antigen [ng/mL] | Post-Treatment TFPI Antigen [ng/mL] | p-Value ** | Pre-Treatment TF Antigen [ng/mL] | Post-Treatment TF Antigen [ng/mL] | p-Value ***       |
|--|------------------------------------|-------------------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| Adjuvant therapy (all types)               | 1.31<br>1.14/1.49                  | 1.71<br>1.15/2.09                   | <b>0.0004</b> | 44.32<br>37.82/57.28               | 42.85<br>36.97/52.62                | 0.8195     | 552.70<br>401.72/721.63          | 827.31<br>660.89/992.22           | <b>&lt;0.0001</b> |
| Monotherapy                                | 1.48<br>1.30/1.60                  | 1.48<br>0.76/2.82                   | 1.0000        | 33.92<br>33.40/60.36               | 33.71<br>32.87/98.36                | 1.0000     | 466.34<br>442.73/752.35          | 653.33<br>498.44/841.96           | 0.8434            |
| Combination therapy with chemotherapy      | 1.30<br>1.10/1.42                  | 1.87<br>1.40/2.20                   | <b>0.0003</b> | 41.68<br>35.60/58.80               | 46.52<br>38.93/56.46                | 0.3820     | 566.96<br>400.86/726.12          | 834.90<br>691.40/973.34           | <b>&lt;0.0001</b> |
| Combination therapy with endocrine therapy | 1.28<br>1.14/1.48                  | 1.72<br>1.30/2.08                   | <b>0.0015</b> | 44.48<br>38.00/55.76               | 43.23<br>38.39/52.48                | 0.8434     | 577.40<br>431.59/726.12          | 866.51<br>679.30/1022.32          | <b>&lt;0.0001</b> |

TFPI: Tissue factor pathway inhibitor; TF: Tissue factor; BCS: breast-conserving surgery; MRM: modified radical mastectomy. Data are expressed as median (Me) and the interquartile range (IQR) [lower quartile (Q1)/upper quartile (Q3)]; p-value \* for differences between pre-treatment and post-treatment TFPI activity; p-value \*\* for differences between pre-treatment and post-treatment TFPI antigen; p-value \*\*\* for differences between pre-treatment and post-treatment TF antigen; significant differences are denoted by bold p-values.

**Table 5.** TF activity, t-PA and PAI-1 antigen concentrations according to the type of adjuvant therapy in IBrC patients.

| Type of Adjuvant Therapy                   | Pre-Treatment TF Activity [U/mL] | Post-Treatment TF Activity [U/mL] | p-Value *     | Pre-Treatment t-PA Antigen [ng/mL] | Post-Treatment t-PA Antigen [ng/mL] | p-Value **        | Pre-Treatment PAI-1 Antigen [ng/mL] | Post-Treatment PAI-1 Antigen [ng/mL] | p-Value ***       |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Adjuvant therapy (all types)               | 12.96<br>11.10/26.40             | 27.13<br>11.67/35.89              | <b>0.0003</b> | 5.70<br>4.26/7.14                  | 3.07<br>2.00/4.95                   | <b>&lt;0.0001</b> | 37.73<br>29.19/45.39                | 78.31<br>47.77/85.19                 | <b>&lt;0.0001</b> |
| Monotherapy                                | 12.31<br>10.61/39.18             | 25.17<br>11.28/43.56              | 0.4990        | 7.16<br>3.04/9.68                  | 3.01<br>2.18/7.41                   | 0.1282            | 38.52<br>35.50/44.60                | 68.42<br>47.33/81.39                 | 0.0425            |
| Combination therapy with chemotherapy      | 13.79<br>11.77/29.88             | 27.41<br>12.12/33.45              | <b>0.0270</b> | 5.79<br>4.42/6.86                  | 2.91<br>1.98/4.21                   | <b>0.0013</b>     | 37.55<br>30.27/45.48                | 78.31<br>47.83/84.33                 | <b>0.0001</b>     |
| Combination therapy with endocrine therapy | 12.46<br>11.03/26.92             | 27.13<br>12.12/37.68              | <b>0.0002</b> | 5.69<br>4.28/6.70                  | 3.14<br>2.02/5.02                   | <b>0.0001</b>     | 36.50<br>27.87/45.48                | 79.20<br>47.70/85.97                 | <b>&lt;0.0001</b> |

TF: Tissue factor; t-PA: Tissue plasminogen activator; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; Data are expressed as median (Me) and the interquartile range (IQR) [lower quartile (Q1)/upper quartile (Q3)]; p-value \* for differences between pre-treatment and post-treatment TF activity; p-value \*\* for differences between pre-treatment and post-treatment TF antigen; p-value \*\*\* for differences between pre-treatment and post-treatment PAI-1 antigen; significant differences are denoted by bold p-values.



**Figure 2.** ROC curve analysis of the investigated haemostatic biomarkers: (A) ROC curve analysis of the pre-treatment haemostatic biomarkers; (B) ROC curve analysis of the post-treatment haemostatic biomarkers.

**Table 6.** Results of diagnostic accuracy for individual pre-treatment haemostatic parameters.

| ROC Data                      | Pre-Treatment TFPI Activity | Pre-Treatment TFPI Antigen | Pre-Treatment TF Antigen | Pre-Treatment TF Activity | Pre-Treatment t-PA Antigen | Pre-Treatment PAI-1 Antigen |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| AUC                           | 0.545                       | 0.496                      | 0.620                    | 0.701                     | 0.596                      | 0.659                       |
| Youden index                  | 0.17                        | 0.16                       | 0.33                     | 0.52                      | 0.33                       | 0.40                        |
| Cut-off point                 | 1.14                        | 60.16                      | 521.76                   | 13.32                     | 5.30                       | 36.46                       |
| Sensitivity (%)               | 90.9                        | 36.4                       | 81.8                     | 90.9                      | 81.8                       | 90.9                        |
| Specificity (%)               | 26.5                        | 79.6                       | 51.0                     | 61.2                      | 51.0                       | 49.0                        |
| Positive predictive value (%) | 21.7                        | 28.6                       | 27.3                     | 34.5                      | 27.3                       | 28.6                        |
| Negative predictive value (%) | 92.9                        | 84.8                       | 92.6                     | 96.8                      | 92.6                       | 96.0                        |
| Accuracy (%)                  | 38.3                        | 71.7                       | 56.7                     | 66.7                      | 56.7                       | 56.7                        |
| <i>p</i> -value               | 0.6224                      | 0.9724                     | 0.2088                   | <b>0.0143</b>             | 0.3449                     | <b>0.0472</b>               |

TFPI: Tissue factor pathway inhibitor; TF: Tissue factor; TF: Tissue factor; t-PA: Tissue plasminogen activator; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; significant differences are denoted by bold *p*-values.

**Table 7.** Results of diagnostic accuracy for individual post-treatment haemostatic parameters.

| ROC Data                      | Post-Treatment TFPI Activity | Post-Treatment TFPI Antigen | Post-Treatment TF Antigen | Post-Treatment TF Activity | Post-Treatment t-PA Antigen | Post-Treatment PAI-1 Antigen |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| AUC                           | 0.606                        | 0.573                       | 0.579                     | 0.544                      | 0.757                       | 0.635                        |
| Youden index                  | 0.27                         | 0.30                        | 0.25                      | 0.26                       | 0.50                        | 0.26                         |
| Cut-off point                 | 1.56                         | 43.23                       | 756.30                    | 41.89                      | 3.13                        | 78.15                        |
| Sensitivity (%)               | 81.8                         | 72.7                        | 81.8                      | 36.4                       | 90.9                        | 72.7                         |
| Specificity (%)               | 44.9                         | 57.1                        | 42.9                      | 89.8                       | 59.2                        | 53.1                         |
| Positive predictive value (%) | 25.0                         | 27.6                        | 24.3                      | 44.4                       | 33.3                        | 25.8                         |
| Negative predictive value (%) | 91.7                         | 90.3                        | 91.3                      | 86.3                       | 96.7                        | 89.7                         |
| Accuracy (%)                  | 51.7                         | 60.0                        | 50.0                      | 80.0                       | 65.0                        | 56.7                         |
| <i>p</i> -value               | 0.2299                       | 0.4281                      | 0.3529                    | 0.6792                     | <b>0.0001</b>               | 0.1616                       |

TFPI: Tissue factor pathway inhibitor; TF: Tissue factor; TF: Tissue factor; t-PA: Tissue plasminogen activator; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; significant differences are denoted by bold *p*-values.



3.5. Survival Analysis Regarding TFPI, TF, t-PA, PAI-1 Antigen Concentrations and TFPI, TF Activities

We next examined the correlation of the studied haemostatic biomarker concentrations and activities with important clinical outcomes in breast cancer. During a median follow-up of 6 years, nine patients had died from systemic metastatic disease and 11 subjects presented with disease progression expressed by distant metastases. The median DFS and OS for the entire study cohort was 71 months (IQR 65–74 months). The corresponding Kaplan–Meier curves are shown in Figures 3–6. The calculated ROC optimal cut-off values of the investigated haemostatic parameters were used as a cut-off point to divide patients into two groups: the group with baseline/post-treatment level below the cut-off point and the group with baseline/post-treatment level above the cut-off value.

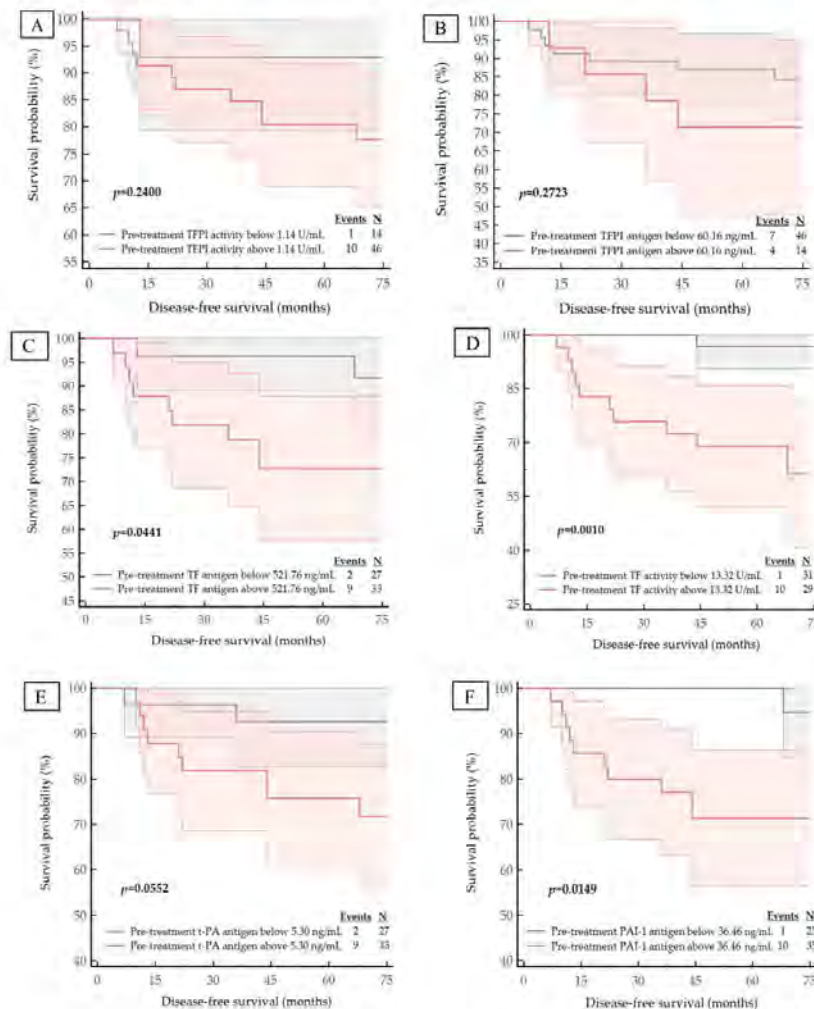
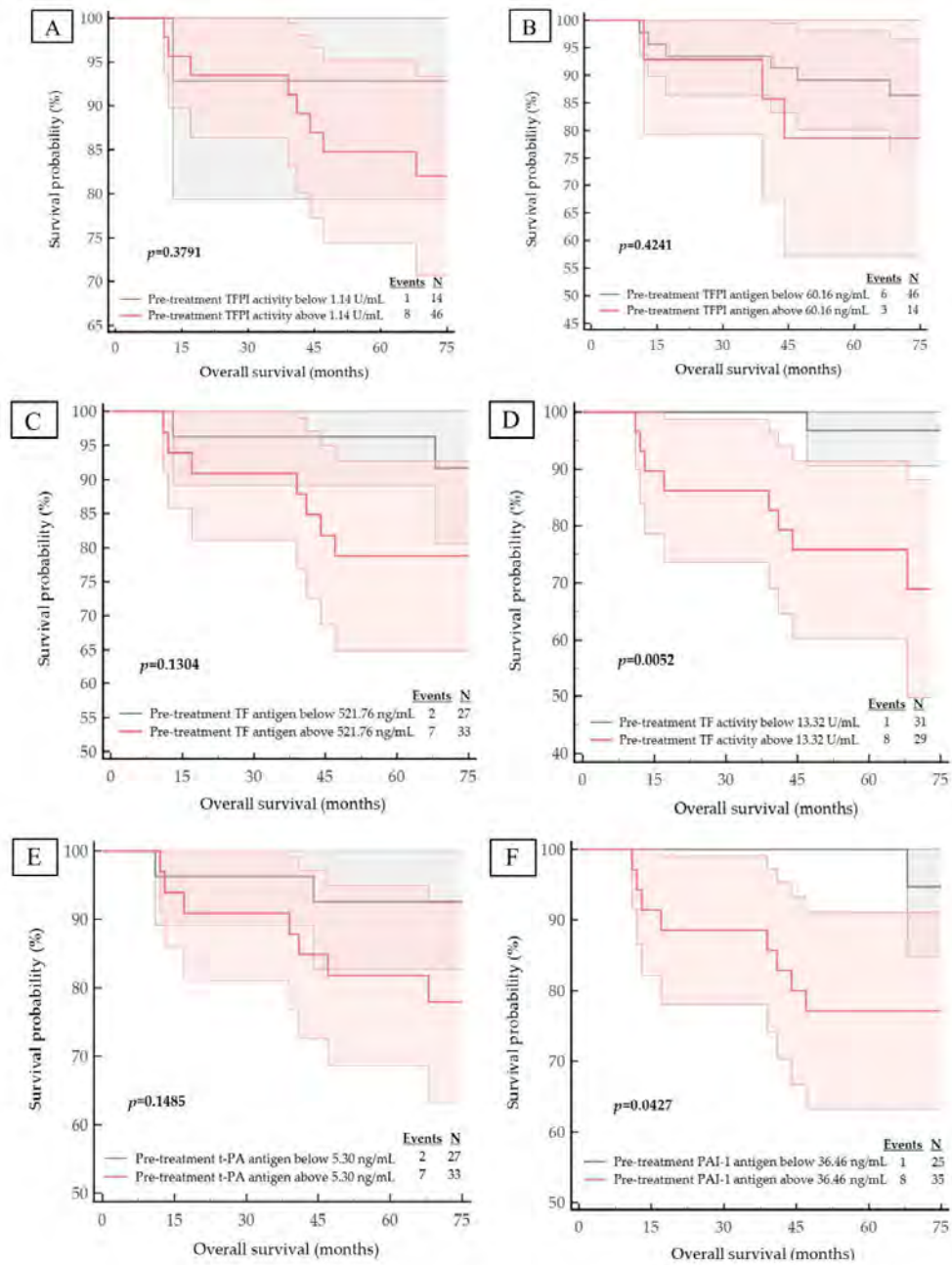
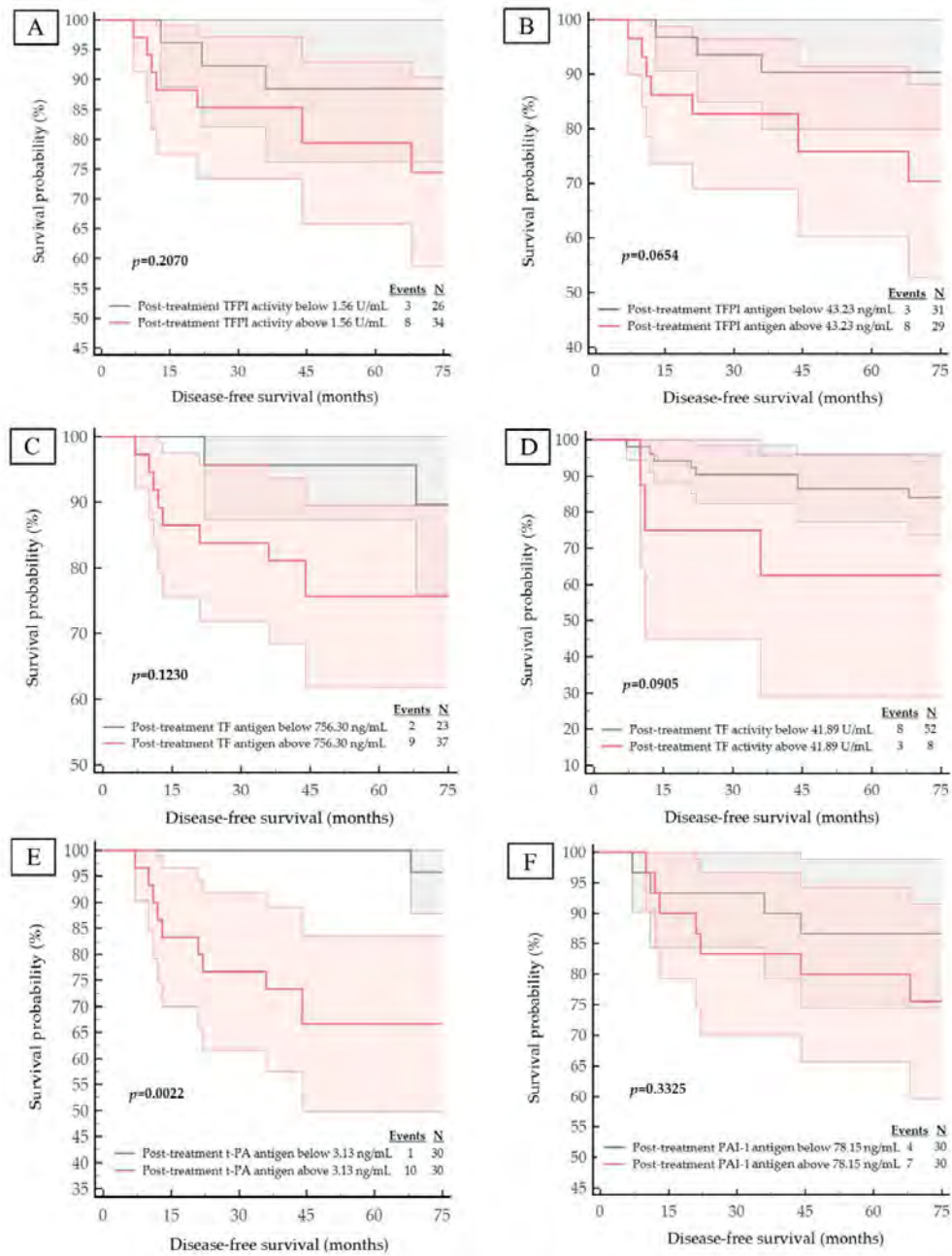


Figure 3. Kaplan–Meier survival plots for the DFS analysis of the studied population regarding to: (A) pre-treatment TFPI activity; (B) pre-treatment TFPI antigen; (C) pre-treatment TF antigen; (D) pre-treatment TF activity; (E) pre-treatment t-PA antigen; (F) pre-treatment PAI-1 antigen.

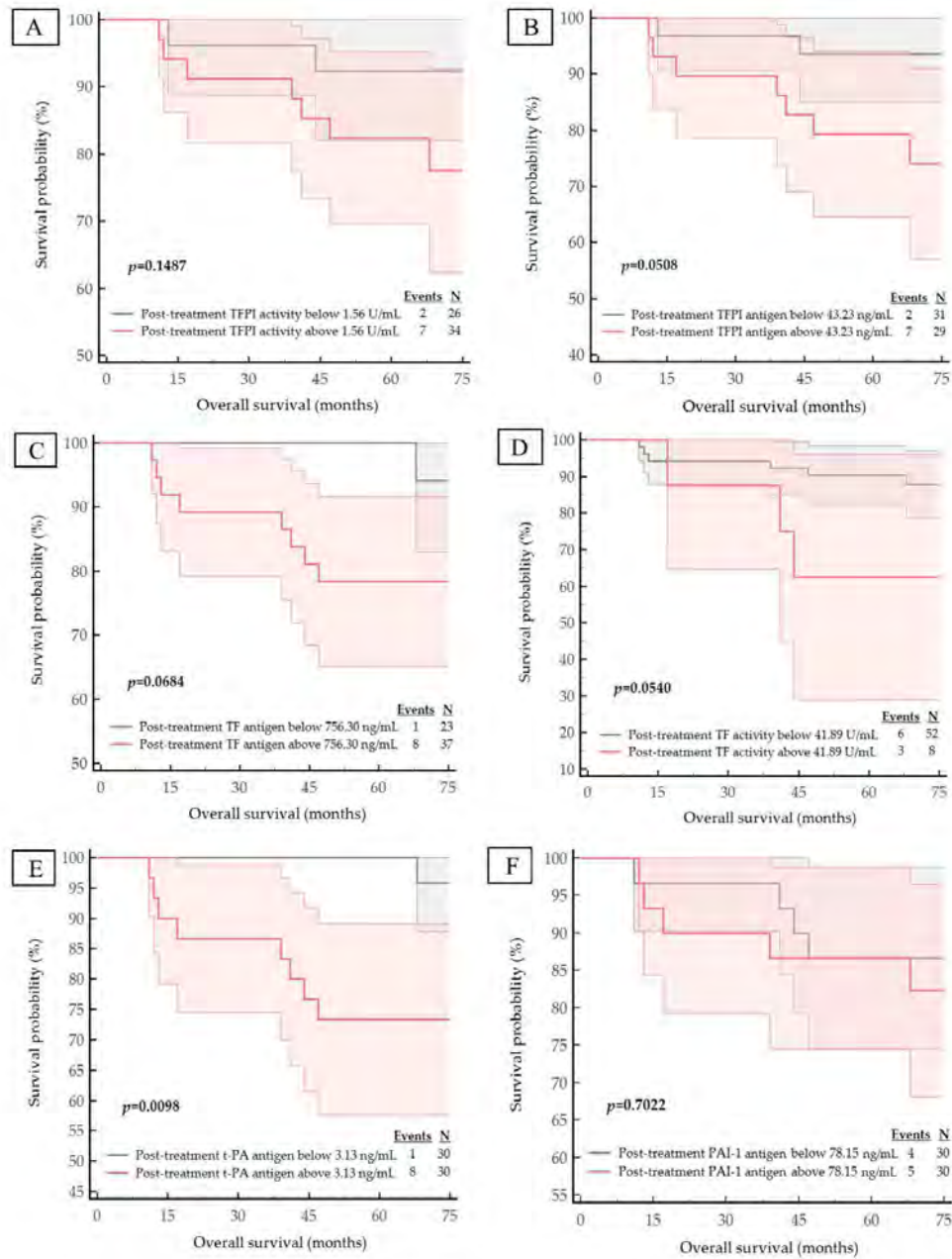




**Figure 4.** Kaplan–Meier survival plots for the OS analysis of the studied population regarding to: (A) pre-treatment TFPI activity; (B) pre-treatment TFPI antigen; (C) pre-treatment TF antigen; (D) pre-treatment TF activity; (E) pre-treatment t-PA antigen; (F) pre-treatment PAI-1 antigen.



**Figure 5.** Kaplan–Meier survival plots for the DFS analysis of the studied population regarding to: (A) post-treatment TFPI activity; (B) post-treatment TFPI antigen; (C) post-treatment TF antigen; (D) post-treatment TF activity; (E) post-treatment t-PA antigen; (F) post-treatment PAI-1 antigen.



**Figure 6.** Kaplan–Meier survival plots for the OS analysis of the studied population regarding to: (A) post-treatment TFPI activity; (B) post-treatment TFPI antigen; (C) post-treatment TF antigen; (D) post-treatment TF activity; (E) post-treatment t-PA antigen; (F) post-treatment PAI-1 antigen.

The Kaplan–Meier curves for high versus low pre-treatment concentrations/activities of the haemostatic parameters demonstrated that high expression pre-treatment—TF antigen ( $p = 0.0441$ ), TF activity ( $p = 0.0010$ ) and PAI-1 antigen ( $p = 0.0149$ )—corresponded with a significantly worse DFS. Similarly, high levels of both pre-treatment TF activity ( $p = 0.0052$ ) and PAI-1 antigen ( $p = 0.0427$ ) are correlated with significantly shorter OS.

Examination of the Kaplan–Meier curves for post-treatment haemostatic biomarker levels revealed that patients with higher post-treatment concentration of the t-PA antigen also appeared to have a poorer prognosis for DFS and OS ( $p = 0.0022$  for DFS;  $p = 0.0098$  for OS), as shown in Figures 5E and 6E. Although the  $p$ -value for the post-treatment TFPI antigen concentration with respect to OS was  $p = 0.0508$ , it was considered to be statistically significant due to its proximity to  $p < 0.05$ ; thus, we postulate that patients with a high post-treatment TFPI concentration have a worse OS outcome.

Additionally, we performed a DFS and OS analysis regarding the form of adjuvant treatment applied. It was found that the type of adjuvant treatment did not significantly affect DFS and OS. An important limitation of this analysis is certainly the varied and unequal number of individual subgroups. While all women in the cohort underwent surgery (mastectomy, BCS or MRM) as a primary treatment, adjuvant treatment varied according to breast cancer subtype. The detailed analysis is presented in Figure S1 (see the Supplementary Materials for further details).

According to the Kaplan–Meier survival analysis we suggest that higher pre-treatment TF antigen, TF activity, PAI-1 antigen concentration and post-treatment t-PA and TFPI antigen concentration may act as a negative prognostic factor for disease recurrence and may increase the risk of death due to breast cancer.

### 3.6. Univariate and Multivariate Analyses of Haemostatic Parameters Contributing to DFS

The prognostic value of the haemostatic biomarkers was confirmed by univariate and multivariate Cox proportional hazards regression analyses (Tables 8 and 9). We used univariable regression to identify each of studied parameters as a risk factor for cancer recurrence. Next, we established a multivariable Cox model to determine an independent predictive value of the investigated haemostatic markers after adjusting for BMI, age at the time of diagnosis, TNM staging, molecular subtype, histological type, nodal involvement and tumour diameter. The calculated HR is presented to quantify its impact on DFS.

**Table 8.** The univariate and multivariate Cox regression models for DFS regarding pre-treatment haemostatic parameters.

| Variables                   | Univariate     |               | Multivariate   |             |
|-----------------------------|----------------|---------------|----------------|-------------|
|                             | HR<br>(95% CI) | $p$ -Values   | HR<br>(95% CI) | $p$ -Values |
| Pre-treatment TFPI activity |                |               |                |             |
| Low                         | 3.20           |               | 3.21           |             |
| High                        | (0.41–24.97)   | 0.2675        | (0.39–26.49)   | 0.2786      |
| Pre-treatment TFPI antigen  |                |               |                |             |
| Low                         | 1.96           |               | 0.51           |             |
| High                        | (0.57–6.72)    | 0.2822        | (0.12–2.19)    | 0.3643      |
| Pre-treatment TF antigen    |                |               |                |             |
| Low                         | 4.24           |               | 4.20           |             |
| High                        | (0.91–19.65)   | 0.0649        | (0.79–22.26)   | 0.0921      |
| Pre-treatment TF activity   |                |               |                |             |
| Low                         | 14.33          |               | 7.91           |             |
| High                        | (1.81–113.28)  | <b>0.0116</b> | (0.87–71.74)   | 0.0660      |

Table 8. Cont.

| Variables                   | Univariate     |                  | Multivariate   |                  |
|-----------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
|                             | HR<br>(95% CI) | <i>p</i> -Values | HR<br>(95% CI) | <i>p</i> -Values |
| Pre-treatment t-PA antigen  |                |                  |                |                  |
| Low                         | 3.99           |                  | 2.68           |                  |
| High                        | (0.86–18.48)   | 0.0768           | (0.53–13.61)   | 0.2332           |
| Pre-treatment PAI-1 antigen |                |                  |                |                  |
| Low                         | 8.39           |                  | 11.84          |                  |
| High                        | (1.07–65.58)   | <b>0.0427</b>    | (0.49–286.23)  | 0.1283           |

TFPI: Tissue factor pathway inhibitor; TF: Tissue factor; t-PA: Tissue plasminogen activator; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1. The Cox proportional hazards model was used for unadjusted univariate and adjusted multivariate analyses—BMI, age at the time of diagnosis, staging, intrinsic type, histological type, nodal involvement and tumour diameter; significant differences are denoted by bold *p*-values.

Table 9. The univariate and multivariate Cox regression models for DFS regarding post-treatment haemostatic parameters.

| Variables                    | Univariate     |                  | Multivariate   |                  |
|------------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
|                              | HR<br>(95% CI) | <i>p</i> -Values | HR<br>(95% CI) | <i>p</i> -Values |
| Post-treatment TFPI activity |                |                  |                |                  |
| Low                          | 2.30           |                  | 2.16           |                  |
| High                         | (0.61–8.69)    | 0.2207           | (0.54–8.68)    | 0.2768           |
| Post-treatment TFPI antigen  |                |                  |                |                  |
| Low                          | 3.25           |                  | 3.18           |                  |
| High                         | (0.86–12.27)   | 0.0822           | (0.66–15.33)   | 0.1499           |
| Post-treatment TF antigen    |                |                  |                |                  |
| Low                          | 3.13           |                  | 2.03           |                  |
| High                         | (0.68–14.49)   | 0.1445           | (0.35–11.64)   | 0.4262           |
| Post-treatment TF activity   |                |                  |                |                  |
| Low                          | 2.98           |                  | 0.49           |                  |
| High                         | (0.79–11.25)   | 0.1074           | (0.06–3.71)    | 0.4895           |
| Post-treatment t-PA antigen  |                |                  |                |                  |
| Low                          | 11.29          |                  | 2.74           |                  |
| High                         | (1.43–89.25)   | <b>0.0216</b>    | (0.68–14.63)   | 0.9954           |
| Post-treatment PAI-1 antigen |                |                  |                |                  |
| Low                          | 1.82           |                  | 2.93           |                  |
| High                         | (0.53–6.21)    | 0.3405           | (0.68–12.59)   | 0.1476           |

TFPI: Tissue factor pathway inhibitor; TF: Tissue factor; t-PA: Tissue plasminogen activator; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1. The Cox proportional hazards model was used for unadjusted univariate and adjusted multivariate analyses—BMI, age at the time of diagnosis, staging, intrinsic type, histological type, nodal involvement and tumour diameter; significant differences are denoted by bold *p*-values.

The univariate analysis identified that high levels of both pre-treatment TF activity and PAI-1 antigen significantly contributed to shorter DFS. According to the calculated ROC optimal cut-off point values, pre-treatment TF activity > 13.32 U/mL and pre-treatment PAI-1 concentration > 36.46 ng/mL are positively correlated with breast cancer recurrence (HR = 14.33, 95% CI = 1.81–113.28, *p* = 0.0116; HR = 8.39, 95% CI = 1.07–65.58, *p* = 0.0427, respectively). At the same time, the univariable analysis of post-treatment haemostatic biomarkers suggested that patients with a post-treatment t-PA concentration > 3.13 ng/mL appear to have a 11.29-times higher risk of disease-specific relapse (HR = 11.29, 95% CI = 1.43–89.25, *p* = 0.0216).

In a multivariate Cox analysis, by including other-related parameters in a model, we found no significant association between the risk of IBrC relapse and the studied variables (*p* > 0.05).



#### 4. Discussion

Haemostasis is an essential process for maintaining the integrity of the circulatory system, and involves several mechanisms such as vasoconstriction, platelet activation, coagulation and fibrinolysis [17]. The association between malignancy and disturbances in the haemostasis balance has been studied for almost two centuries [18]. In recent years, a large number of researchers have reported a significant role of both coagulation and fibrinolytic parameters in the pathogenesis of several cancers as prognostic and predictive indicators of survival and future clinical outcomes [19]. There is much evidence indicating that components of the haemostatic system contribute to the fundamental aspects of tumour biology, such as angiogenesis, metastasis, cancer progression and modulation of immune responses [20,21]. Moreover, the haemostatic system is not only affected by malignancy, but primary and adjuvant cancer-related treatment may also play a crucial role in the dysregulation of haemostatic interactions [22].

In this study, as a first step, we investigated the prognostic role of haemostatic parameters, TFPI, TF, t-PA and PAI-1, as potential prognostic factors of breast cancer recurrence and OS. Furthermore, we decided to establish the potential influence of adjuvant treatment on the concentrations and activities of the investigated haemostatic biomarkers. This approach has facilitated the determination of the effect of anticancer treatment on survival with respect to coagulation and fibrinolysis components.

##### 4.1. TF, TFPI, t-PA and PAI-1 as Prognostic Indicators of Survival

The correlation between TFPI, TF, t-PA and PAI-1 values and the probability of IBrc recurrence has been investigated by numerous researchers, and this observation is consistent with our study. Interestingly, the 71-month median follow-ups revealed a significantly higher incidence of cancer-specific death or disease relapse in IBrc patients with higher baseline levels of TF and the PAI-1 antigen. According to the post-treatment analysis, we also found that higher concentrations of t-PA and TFPI strongly correspond with a worse survival outcome. Using a univariate Cox analysis, we confirmed the predictive value of the haemostatic biomarkers as indicators of DFS.

Patients in the group with baseline TF activity > 13.32 U/mL presented an over 14-times higher risk of disease relapse (HR = 14.33; 95% CI = 1.81–113.28) and obtained a significantly shorter DFS and OS. Our findings corroborate the results of research conducted between 1983 and 1996 by Ueno et al. who performed an ELISA in the plasma of 67 breast cancer patients and immunohistochemistry in 213 breast cancer tissues. The authors revealed that TF overexpression is associated with up-regulated TF plasma levels and poor OS in primary and recurrent breast cancer patients. They suggested that TF promotes cancer invasion and metastasis both through hypercoagulation initiation and through activation of the intracellular signalling pathways in TF-expressing cells [23]. Surprisingly, Stämpfli et al. obtained results completely inconsistent with our current study. Although, the authors reported that TF was expressed in 99% of breast cancer specimens, they did not support a prognostic impact of TF expression on a breast cancer patient's OS [24]. However, when evaluating this discrepancy, it must be taken into account that the above-mentioned study used a cancer tissue as a biological material, while our study assessed TF activity in plasma.

Furthermore, a pre-treatment PAI-1 concentration > 36.46 ng/mL also corresponds with a poorer outcome (shorter DFS and OS) and shows an association with an over 8-times-higher risk of cancer recurrence. As a natural inhibitor of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and tissue-type plasminogen activator (t-PA)—two molecules commonly associated with angiogenesis, metastasis and cancer progression—it was expected that PAI-1 would successfully prevent the development of cancers. In contrast, many studies have revealed that high levels of PAI-1 are correlated with a poor rather than a favourable clinical outcome [25,26]. The inverse relation between PAI-1 level and survival has been confirmed by Ferroni et al.'s research. Using Kaplan–Meier analysis and a Cox proportional hazard model, the authors reported that an elevated plasma PAI-1 level had a negative

prognostic impact in terms of both relapse-free (RFS) and OS and serves as an independent biomarker for predicting the disease outcome in breast cancer patients [27]. The potential paradoxical pro-tumourigenic mechanism of PAI-1 in cancer pathogenesis may result from its anti-apoptotic, anti-protease and vitronectin-binding functions leading to concentration-dependent pro-angiogenic activity [26,28]. It has been proved that PAI-1 stimulates angiogenesis by initiating the migration of endothelial cells from vitronectin towards fibronectin, secondarily promoting the elongation of micro-vessels supported by fibronectin [29].

With respect to post-treatment analysis, we postulate that a t-PA concentration  $> 3.13$  ng/mL may predict a poor clinical outcome in terms of DFS and OS. Our analysis showed that most patients with cancer relapse or cancer-specific death displayed elevated plasma levels of post-treatment t-PA. A negative association between the post-treatment t-PA concentration and survival was finally confirmed using a Cox proportional hazards regression analysis which showed that patients with higher after-therapy t-PA levels have an 11.29-times increased risk of disease recurrence (HR = 11.29, 95% CI = 1.43–89.25). There is not much data supporting a potential predictive value of t-PA with respect to the adjuvant chemotherapy received. Teliga-Czajkowska et al. presented that a high t-PA plasma level at the onset of chemotherapy was associated with shorter OS and DFS in patients with ovarian cancer, but they found no significant differences in DFS and OS after three and six cycles of chemotherapy [30]. Another study conducted by Corte et al. showed no significant relation between intra-tumoural t-PA levels and RFS and OS prognosis in breast cancer patients in accordance with the type of systemic adjuvant therapy received. The authors controvert the clinical prognostic usefulness of t-PA and its predictive value in systemic adjuvant therapy [31]. Further research is needed to establish these inconsistent results.

Similarly, we observed a negative impact of post-treatment TFPI concentration in terms of OS. Unfortunately, we did not find any study which investigated the prognostic value of post-treatment TFPI in breast or other types of cancer.

#### 4.2. The Impact of Adjuvant Therapy on Haemostatic Parameter Levels

Our primary goal was to determinate the potential impact of adjuvant treatment on the TFPI, TF, t-PA and PAI-1 levels to better understand the effect of anticancer therapy on coagulation and the fibrinolysis process. We came to the conclusion that both therapy combined with chemotherapy and therapy combined with hormonal therapy, as well as radiotherapy, significantly increased the concentrations of plasma TF and the PAI-1 and also activity of TF and TFPI, but significantly decreased the t-PA antigen ( $p < 0.05$ ). What is more, the use of monotherapy has no significant effect on haemostatic biomarker levels. Based on these results, we postulate that TFPI, TF, t-PA and PAI-1 may act as biomarkers for monitoring therapy in patients with breast cancer. As is known, the main purpose of systemic adjuvant treatment is to improve the cure rates by reducing and controlling distant and local recurrence [32,33]. Despite the general positive effect of adjuvant treatment on decreasing the risk of breast cancer recurrence and mortality, there is clear available evidence that post-surgery hormonal therapy and cytotoxic chemotherapy contribute to the unfavourable hypercoagulable state [22].

Since we have revealed that elevated levels of TFPI, TF, t-PA and PAI-1 are associated with a poor prognosis in IBrc patients, we propose that adjuvant therapy negatively affects haemostasis by promoting a hypercoagulable state along with initiating imbalance in the fibrinolysis process. Khorana et al. reported elevated levels of plasma TF antigen and activity during the course of chemotherapy and suggested its predictive role for subsequent venous thromboembolism (VTE) events in patients with pancreatic cancer [34]. In addition, Bertomeu et al. demonstrated that chemotherapeutic drugs administered to stage II breast cancer patients may induce profound changes at the endothelial cell level and increase levels of procoagulant molecules, especially cytokines, which subsequently affect the thrombotic process [35]. Based on this observation, we speculate that direct post-chemotherapy damage to the vascular endothelium, which is the mean surface of TF

exposition, can lead to increased expression and activity of TF, promoting the hypercoagulable state. With regard to the fibrinolytic factors, Rella et al. observed a significant increase in plasma PAI-1 antigen levels after starting chemotherapy, lasting until the last cycle, which is also in line with our findings [36]. Similar to the above, it may be hypothesised that chemotherapy-induced endothelial injury enhances the production and secretion of PAI-1, the most important physiological inhibitor of fibrinolysis, and results in an antifibrinolytic condition that may contribute to the pathogenesis of thrombotic microangiopathy [37]. Furthermore, PAI-1, as a serpin-inhibiting caspase-3, promotes cell survival and protects tumour cells from chemotherapy-induced apoptosis [26]. Moreover, endocrine therapy with tamoxifen is an additional risk factor for VTE in breast cancer patients. Interestingly, Saphner et al. noted that the combination of chemotherapy and tamoxifen was associated with higher risk of venous and arterial thromboembolic complications than chemotherapy alone in premenopausal breast cancer patients [38]. Although there are plenty of studies demonstrating that tamoxifen activity might elevate the risk of VTE through the depletion of antithrombin, protein C and protein S, there are few studies assessing the effects of hormone treatment on the haemostatic biomarkers investigated in our study [39–42]. However, Trappenburg et al. demonstrated that endocrine therapy increases the number of circulating TF-bearing microparticles and heightens the procoagulant state in breast cancer patients [43]. Unfortunately, the mechanism by which endocrine therapy contributes to the increase in TF in the course of VTE is not clearly understood. According to the impact of adjuvant therapy on TFPI, we found completely inconsistent results to our current study in the available literature. Aharon et al. observed a significant decrease in the levels of TFPI-bearing extracellular vesicles at the end of neo-adjuvant and adjuvant chemotherapy in breast cancer treatment [44]. Likewise, a study conducted by Blondon et al. demonstrated a significant association of tamoxifen use with decreases in plasma levels of TFPI, which may be an important explanation for the procoagulant risk of tamoxifen in breast cancer patients [45]. Therefore, based on our current results, we hypothesise that elevated post-treatment plasma activity of TFPI results in the compensatory release of TF associated with up-regulation of the expression of TF both by tumour cells and endothelial cells damaged by adjuvant therapy. Finally, our findings concerning post-treatment changes in t-PA levels were consistent with the study conducted by Al-Youzbaki et al. where a significant decrease in the t-PA serum level in breast cancer patients who received six cycles of chemotherapy was observed [46]. Moreover, Lox et al. observed a significant increase in t-PA and PAI-1 levels in 26 tamoxifen-treated breast cancer patients, which is also in line with our findings [47]. Since we have proved a negative association between the post-treatment t-PA concentration and survival, we propose that t-PA may act as biomarker for monitoring therapy in breast cancer patients.

#### 4.3. Limitations of the Study

There are certain limitations to this study, consisting of its small sample size and the lack of a control group, that may have implications for future research. Nevertheless, the study was performed in a daily clinical routine, and the sample size was dependent on receiving patients' consent for participation. Furthermore, very restrictive inclusion and exclusion criteria also influenced the limited number of patients in the project. The present study excluded the patients who have undergone neoadjuvant therapy, what would disturb the assessment of the condition of the vascular endothelium and the analysed haemostatic factors. Nowadays, the standard treatment of patients in stage III or higher requires treatment with neoadjuvant chemotherapy, followed by surgery. Thus, we enrolled to the study patients only in I and II stage of invasive breast cancer. It is worth noting that our cohort was from a single institution, and thus the results of our research should be further validated in a multi-centre study recruiting a larger population and including a control group. Despite some limitations, the main conclusions of this investigation are consistent with recent trial and population studies performed by other authors. Thus, 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 the haemostatic parameters. Hence, the elimination of patients with late-stage BrC allowed us to investigate specifically the association between stage IA–IIB of BrC and haemostatic profile, regardless of the essential confounders.

## 5. Conclusions

Our results point out that adjuvant therapy significantly increased the concentrations of plasma TF and the PAI-1 as well as activity of TF and TFPI but significantly decreased the levels of the t-PA antigen. Considering the role of haemostatic biomarkers and an enhanced effect of anticancer treatment on the hypercoagulable and hypofibrinolytic state, we suggest that breast cancer patients receiving adjuvant therapy have a higher risk of developing venous and arterial thromboembolic complications. Additionally, both pre-treatment TF activity and PAI-1 concentration and also post-treatment t-PA concentration were associated with the future outcomes of IBrC patients, since a pre-treatment TF activity above 13.32 U/mL, a pre-treatment PAI-1 concentration > 36.46 ng/mL and a post-treatment t-PA concentration > 3.13 ng/mL have been shown to promote the probability of recurrence and morbi-mortality in the IBrC cohort.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/life13051106/s1>, Table S1: The hemostatic profile analysis of pre/post treatment TFPI activity, TFPI antigen and TF antigen in respect to clinicopathological features; Table S2: The hemostatic profile analysis of pre/post treatment TF activity, t-PA antigen and PAI-1 antigen in respect to clinicopathological features; Figure S1: Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) analysis of the studied population regarding types of adjuvant therapy in IBrC patients.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.R.-C. and K.W.; methodology, B.R.-C. and K.K.; software, K.W.; validation, K.W., B.R.-C. and K.K.; formal analysis, K.W.; investigation, K.W. and B.R.-C.; resources, B.R.-C. and P.R.; data curation, B.R.-C.; writing—original draft, K.W. and B.R.-C.; writing—review & editing, B.R.-C.; visualization, K.W. and K.K.; 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 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. Moo, T.A.; Sanford, R.; Dang, C.; Morrow, M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.* **2018**, *13*, 339–354. [CrossRef] [PubMed]
2. Cheung, K.L. Treatment Strategies and Survival Outcomes in Breast Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 735. [CrossRef]
3. Fragomeni, S.M.; Sciallis, A.; Jeruss, J.S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2018**, *27*, 95–120. [CrossRef]
4. Flatley, M.J.; Dodwell, D.J. Adjuvant treatment for breast cancer. *Surgery* **2019**, *37*, 176–180.
5. Nasser, N.J.; Fox, J.; Agbarya, A. Potential Mechanisms of Cancer-Related Hypercoagulability. *Cancers* **2020**, *12*, 566. [CrossRef]
6. Cancer-Associated Hypercoagulable State: Causes and Mechanisms. Available online: <https://www.medilibrary.org/uptodate/show/1353> (accessed on 12 February 2023).

7. Reyes Gil, M. Overview of the Coagulation System. In *Transfusion Medicine and Hemostasis*, 3rd ed.; Shaz, B.H., Hillyer, C.D., Reyes Gil, M., Eds.; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 559–564.
8. Sánchez-Villegas, A.; Sánchez-Tainta, A. (Eds.) Virgin Olive Oil: A Mediterranean Diet Essential. In *The Prevention of Cardiovascular Disease through the Mediterranean Diet*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 59–87.
9. Fainchtein, K.; Tera, Y.; Kearns, N.; Noureldin, A.; Othman, M. Hypercoagulability and Thrombosis Risk in Prostate Cancer: The Role of Thromboelastography. *Semin. Thromb. Hemost.* **2023**, *49*, 111–118. [CrossRef]
10. Falanga, A.; Marchetti, M.; Vignoli, A. Coagulation and cancer: Biological and clinical aspects. *J. Thromb. Haemost.* **2013**, *11*, 223–233. [CrossRef]
11. Moik, F.; Ay, C. Hemostasis and cancer: Impact of haemostatic biomarkers for the prediction of clinical outcomes in patients with cancer. *J. Thromb. Haemost.* **2022**, *20*, 2733–2745. [CrossRef]
12. Bauer, A.T.; Gorzelanny, C.; Gebhardt, C.; Pantel, K.; Schneider, S.W. Interplay between coagulation and inflammation in cancer: Limitations and therapeutic opportunities. *Cancer Treat. Rev.* **2022**, *102*, 102322. [CrossRef] [PubMed]
13. Falanga, A. Mechanisms of hypercoagulation in malignancy and during chemotherapy. *Haemostasis* **1998**, *28*, 50–60. [CrossRef]
14. Kwaan, H.C.; Lindholm, P.F. Fibrin and Fibrinolysis in Cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* **2019**, *45*, 413–422. [CrossRef] [PubMed]
15. Haddad, T.C.; Greeno, E.W. Chemotherapy-induced thrombosis. *Thromb. Res.* **2006**, *118*, 555–568. [CrossRef] [PubMed]
16. Serra, R.; Buffone, G.; Miglietta, A.M.; Abonante, S.; Giordano, V.; Renne, M.; Lugarà, M.; de Franciscis, S. Breast cancer and venous disease: A retrospective cohort study. *Ann. Vasc. Surg.* **2013**, *27*, 762–766. [CrossRef] [PubMed]
17. Zaidi, A.; Green, L. Physiology of haemostasis. *Anaesth. Intensive Care Med.* **2019**, *20*, 152–158. [CrossRef]
18. Palumbo, J.S. Crosstalk between hemostasis and immunity in cancer pathogenesis. *Thromb. Res.* **2022**, *213*, 3–7. [CrossRef]
19. Soeroso, N.N.; Rizki Ananda, F.; Samosir, G.; Hariman, H.; Chairani Eyanoe, P. The correlation between hemostatic parameters and mortality rate in patients with non-small cell lung cancer. *Hematol. Rep.* **2021**, *13*, 8361. [CrossRef]
20. Wojtkiewicz, M.Z.; Sierko, E.; Hempel, D.; Tucker, S.C.; Honn, K.V. Platelets and cancer angiogenesis nexus. *Cancer Metastasis Rev.* **2017**, *36*, 249–262. [CrossRef]
21. Lima, L.G.; Monteiro, R.Q. Activation of blood coagulation in cancer: Implications for tumour progression. *Biosci. Rep.* **2013**, *4*, e00064. [CrossRef]
22. Caine, G.J.; Stonelake, P.S.; Lip, G.Y.; Kehoe, S.T. The hypercoagulable state of malignancy: Pathogenesis and current debate. *Neoplasia* **2002**, *4*, 465–473. [CrossRef]
23. Ueno, T.; Toi, M.; Koike, M.; Nakamura, S.; Tominaga, T. Tissue factor expression in breast cancer tissues: Its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 164–170. [CrossRef]
24. Stampfli, S.F.; Akhmedov, A.; Hausladen, S.; Varga, Z.; Dedes, K.J.; Hellermann, J.; Luscher, T.F.; Kristiansen, G.; Tanner, F.C.; Breitenstein, A. Tissue Factor Expression Does Not Predict Mortality in Breast Cancer Patients. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 3259–3264.
25. Yu, B.; Zhang, G.; Jin, L.; Zhang, B.; Yan, D.; Yang, H.; Ye, Z.; Ma, T. Inhibition of PAI-1 Activity by Toddalolactone as a Mechanism for Promoting Blood Circulation and Removing Stasis by Chinese Herb *Zanthoxylum nitidum* var. *tomentosum*. *Front. Pharmacol.* **2017**, *21*, 489. [CrossRef] [PubMed]
26. Kubala, M.H.; DeClerck, Y.A. The plasminogen activator inhibitor-1 paradox in cancer: A mechanistic understanding. *Cancer Metastasis Rev.* **2019**, *38*, 483–492. [CrossRef]
27. Ferroni, P.; Roselli, M.; Portarena, I.; Formica, V.; Riordino, S.; La Farina, F.; Costarelli, L.; Melino, A.; Massimiani, G.; Cavaliere, F.; et al. Plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels in breast cancer-relationship with clinical outcome. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 1153–1161.
28. Placencio, V.R.; DeClerck, Y.A. Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cancer: Rationale and Insight for Future Therapeutic Testing. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2969–2974. [CrossRef] [PubMed]
29. Isogai, C.; Laug, W.E.; Shimada, H.; Declerck, P.J.; Stins, M.F.; Durden, D.L.; Erdreich-Epstein, A.; DeClerck, Y.A. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5587–5594. [PubMed]
30. Teliga-Czajkowska, J.; Sienko, J.; Jalinik, K.; Smolarczyk, R.; Czajkowski, K. Prognostic value of tissue plasminogen activator (tPA) in patients with epithelial ovarian cancer undergoing chemotherapy. *Ginekol. Pol.* **2019**, *90*, 235–241. [CrossRef] [PubMed]
31. Corte, M.D.; Lamelas, M.L.; Allende, M.T.; Fueyo, A.; Vizoso, F.; Vérez, P.; Rodríguez, J.C.; Roibás, A.; Domínguez, M.L.; Vazquez, J.; et al. Tissue-Type plasminogen activator (tPA) in breast cancer: Relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *Breast Cancer Res.* **2005**, *90*, 33–40. [CrossRef]
32. Samuel, E.; Moore, M.; Voskoboinik, M.; Shackleton, M.; Haydon, A. An update on adjuvant systemic therapies in melanoma. *Melanoma Manag.* **2019**, *6*, MMT28. [CrossRef]
33. Kosmider, S.; Lipton, L. Adjuvant therapies for colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 3799–3805. [CrossRef]
34. Khorana, A.A.; Francis, C.W.; Menzies, K.E.; Wang, J.G.; Hyrien, O.; Hathcock, J.; Mackman, N.; Taubman, M.B. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J. Thromb. Haemost.* **2008**, *6*, 1983–1985. [CrossRef] [PubMed]
35. Bertomeu, M.C.; Gallo, S.; Lauri, D.; Levine, M.N.; Orr, F.W.; Buchanan, M.R. Chemotherapy enhances endothelial cell reactivity to platelets. *Clin. Exp. Metastasis* **1990**, *8*, 511–518. [CrossRef] [PubMed]



36. Rella, C.; Coviello, M.; Giotta, E.; Maiello, E.; Colavito, P.; Colangelo, D.; Quaranta, M.; Colucci, G.; Schittulli, F. A prothrombotic state in breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **1996**, *40*, 151–159. [CrossRef] [PubMed]
37. Lugassy, G.; Falanga, A.; Kakkar, A.K.; Rickles, F.R. Effects of cancer-related and chemotherapy-induced endothelial damage on fibrinolysis. In *Thrombosis and Cancer*, 1st ed.; Martin Dunitz: London, UK, 2004; p. 121.
38. Saphner, T.; Tormey, D.C.; Gray, R. Venous and arterial thrombosis in patients who received adjuvant therapy for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **1991**, *9*, 286–294. [CrossRef]
39. Hamza, M.S.; Mousa, S.A. Cancer-Associated Thrombosis: Risk Factors, Molecular Mechanisms, Future Management. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2020**, *26*, 1076029620954282. [CrossRef]
40. Koster, T.; Rosendaal, F.R.; de Ronde, H.; Briet, E.; Vandenbroucke, J.P.; Bertina, R.M. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet* **1993**, *342*, 1503–1506. [CrossRef]
41. Liberti, G.; Bertina, R.M.; Rosendaal, F.R. Hormonal state rather than age influences cut-off values of protein S: Reevaluation of the thrombotic risk associated with protein S deficiency. *Thromb. Haemost.* **1999**, *82*, 1093–1096. [CrossRef]
42. Pemberton, K.D.; Melissari, E.; Kakkar, V.V. The influence of tamoxifen in vivo on the main natural anticoagulants and fibrinolysis. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **1993**, *4*, 935–942. [CrossRef]
43. Trappenburg, M.C.; van Schilfhaarde, M.; Bredewold, E.O.; van Aalderen, M.C.; Spronk, H.M.; Ten Cate, H.; Leyte, A.; Terpstra, W.E. Elevated numbers and altered subsets of procoagulant microparticles in breast cancer patients using endocrine therapy. *Thromb. Res.* **2011**, *27*, 363–369. [CrossRef]
44. Aharon, A.; Sabbah, A.; Ben-Shaul, S.; Berkovich, H.; Loven, D.; Brenner, B.; Bar-Sela, G. Chemotherapy administration to breast cancer patients affects extracellular vesicles thrombogenicity and function. *Oncotarget* **2017**, *8*, 63265–63280. [CrossRef]
45. Blondon, M.; Bodmer, A.; Thouvenin, L.; Lecomte, T.; Righini, M.; Fontana, P.; Casini, A. Differential impact of tamoxifen and aromatase inhibitors on thrombin generation: The prospective HEMOBREAST cohort. *Blood Adv.* **2022**, *6*, 2884–2892. [CrossRef] [PubMed]
46. Al-Youzbaki, W.B.; Al-Youzbaki, N.B.; Telfah, M.M. Tissue polypeptide antigen & interleukin-6: Are their serum levels a predictor for response to chemotherapy in breast cancer? *Pak. J. Med. Sci.* **2014**, *30*, 1108–1112. [PubMed]
47. von Tempelhoff, G.F.; Pollow, K.; Schneider, D.; Heilmann, L. State-of-the-Art Review: Chemotherapy and Thrombosis in Gynecologic Malignancy. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **1999**, *5*, 92–104. [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.

## IV. Podsumowanie

Stale rosnąca liczba zachorowań na raka piersi wskazuje, że istnieje absolutna potrzeba lepszego zrozumienia komórkowych i molekularnych podstaw tego nowotworu w celu ulepszenia i zwiększenia skuteczności w zakresie profilaktyki i terapii. Optymalne leczenie chorych na raka piersi wymaga podejścia multidyscyplinarnego, obejmującego wykorzystanie określonych czynników prognostycznych przewidujących przebieg choroby i rokowanie. Dostępne obecnie markery obejmują zarówno tradycyjne czynniki kliniczne, jak i czynniki biochemiczno-molekularne. Wdrożenie tych czynników do codziennej praktyki onkologicznej może znacząco usprawnić selekcję pacjentek z grupy wysokiego ryzyka rozwinięcia bardziej złośliwego typu raka piersi, ocenę rokowania oraz prowadzenie i monitorowanie terapii.

Badania prowadzone w ciągu ostatnich pięciu dekad wykazały istotną zależność pomiędzy występowaniem choroby nowotworowej a funkcjonowaniem układu hemostatycznego. U kobiet chorych na raka piersi związek między nowotworem a układem hemostatycznym jest coraz częściej uznawany za ważny i niezależny czynnik regulujący progresję raka piersi. W rzeczywistości, elementy układu hemostatycznego, w tym płytki krwi oraz czynniki układu krzepnięcia i fibrynolizy mogą wpływać na wiele procesów pośredniczących w progresji raka piersi.

Oprócz tradycyjnych czynników kliniczno-patologicznych rutynowo stosowanych w ocenie rokowania raka piersi, do dobrze zweryfikowanych prognostycznych markerów biologicznych należą również elementy układu hemostatycznego, które są bezpośrednio związane z procesem nowotworzenia. Zarówno czynniki układu krzepnięcia, jak i układu fibrynolizy zaangażowane są w przebieg angiogenezy, wzrost guza oraz powstawanie przerzutów, co ma istotny wpływ na dalsze przeżycie pacjentek z rakiem piersi. Zważywszy na kluczowy udział elementów hemostazy w patogenezie raka piersi, czynniki krzepnięcia i fibrynolizy, w tym TF, TFPI, t-PA, u-PA oraz PAI-1 mogą pełnić rolę obiecujących kandydatów stosowanych jako potencjalne biomarkery prognostyczne raka piersi.

Obecne leczenie przeciwnowotworowe jest skuteczną i niezawodną metodą leczenia wielu rodzajów nowotworów. Niemniej jednak, u pacjentek otrzymujących terapię uzupełniającą obserwuje się zwiększone ryzyko zakrzepicy, niezależnie od nowotworu. Stosowanie cytotoksycznych środków chemioterapeutycznych, a także terapii hormonalnej,

radioterapii i terapii celowanej wykazało występowanie skutków ubocznych prowadzących do zaburzeń procesu hemostazy i rozwoju incydentów prozakrzepowych.

Biorąc pod uwagę ryzyko występowania powikłań zakrzepowych związanych ze stosowaniem terapii przeciwnowotworowej, istotne jest określenie dokładnego wpływu leczenia uzupełniającego na stężenie i aktywność poszczególnych parametrów zaangażowanych w proces krzepnięcia i fibrynolizy. Ponadto, kluczowe jest określenie wartości prognostycznej tych biomarkerów w celu przewidzenia naturalnego przebiegu choroby nowotworowej oraz odpowiedzi na zastosowane leczenie u pacjentek z rakiem piersi.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że terapia uzupełniająca istotnie zwiększa osoczowe stężenie TF i PAI-1 oraz aktywność TF i TFPI, jednocześnie znacząco obniża stężenie t-PA. Biorąc pod uwagę rolę biomarkerów hemostatycznych oraz nasilony wpływ leczenia przeciwnowotworowego na stan nadkrzepliwości i hipofibrynolizy, można sugerować, że u chorych na raka piersi leczonych terapią uzupełniającą istnieje wyższe ryzyko wystąpienia żylnych i tętniczych powikłań zakrzepowo-zatorowych.

Dodatkowo podjęto próbę oceny wartości prognostycznej wybranych czynników hemostatycznych. Wykazano, że zarówno aktywność TF przed leczeniem, jak i stężenie PAI-1, a także stężenie t-PA przed i po leczeniu są powiązane z przyszłymi wynikami związanymi z przeżyciem pacjentek. Wyższe przedoperacyjne stężenie t-PA  $> 1,41$  ng/ml w osoczu kobiet z rakiem piersi jest istotnie powiązane z korzystnym rokowaniem w aspekcie czasu wolnego od choroby nowotworowej. Jednocześnie, pacjentki z wyższym stężeniem antygenu t-PA  $> 3,13$  ng/ml po leczeniu charakteryzowały się gorszym rokowaniem w zakresie przeżycia wolnego od choroby oraz przeżycia całkowitego. W kontekście pozostałych czynników, wyższa przedoperacyjna aktywność TF oraz stężenie PAI-1 zwiększają prawdopodobieństwo nawrotu raka piersi i śmierci spowodowanej chorobą przerzutową. Uzyskane wyniki mogą stanowić doskonałą podstawę do dalszych, dynamicznie rozwijających się badań ukierunkowanych na analizę roli czynników hemostatycznych w progresji raka. Być może podjęcie kolejnych prób zrozumienia skomplikowanych patomechanizmów angażujących czynniki hemostatyczne w procesie nowotworzenia umożliwi skuteczną implikację uzyskanych wyników do codziennej praktyki onkologicznej.

## V. Wnioski

### Publikacja nr 1

#### **Tissue plasminogen activator as a possible indicator of breast cancer relapse: A preliminary, prospective study.**

1. Tkankowy aktywator plazminogenu jest biomarkerem o wysokim potencjale prognostycznym. Niniejsze badania udowodniły, że niskie wyjściowe stężenie t-PA w osoczu jest silnym czynnikiem przewidującym ryzyko nawrotu choroby nowotworowej oraz negatywnym markerem prognostycznym u pacjentek z nowotworem piersi. Z kolei wysokie przedoperacyjne stężenie t-PA w jest istotnie powiązane z korzystnym rokowaniem w aspekcie czasu wolnego od choroby nowotworowej.
2. Niska aktywność PAI-1 skorelowana jest z lepszymi wynikami klinicznymi. Pacjentki z niską aktywnością PAI-1 charakteryzowały się znacząco dłuższym czasem przeżycia wolnym od choroby w porównaniu z pacjentkami z wyższą aktywnością PAI-1.
3. Biorąc pod uwagę biologię i heterogeniczność raka piersi, można spekulować, że w przypadkach, w których występuje wyższe stężenie t-PA lub niższa aktywność PAI-1, istnieje możliwość nasilenia procesu fibrynolizy, co wiąże się z lepszym rokowaniem.

### Publikacja nr 2

#### **Hypercoagulability state combined with post-treatment hypofibrinolysis in invasive breast cancer: a seven-year follow-up evaluating disease-free and overall survival.**

1. Zastosowanie skojarzonego leczenia uzupełniającego u pacjentek z pierwotnym, jednostronnym nowotworem piersi zwiększyło osoczowe stężenie TF i PAI-1 oraz aktywność TF i TFPI, a jednocześnie obniżyło stężenie t-PA. W przypadku stosowania radioterapii, chemioterapii lub hormonoterapii jako jedynej formy leczenia uzupełniającego (monoterapii) nie obserwuje się statystycznie istotnych różnic pomiędzy wyjściowym i pooperacyjnym poziomem biomarkerów hemostatycznych.
2. Biorąc pod uwagę rolę biomarkerów hemostatycznych oraz nasilony wpływ leczenia przeciwnowotworowego na stan nadkrzepliwości i hipofibrynolizy, można sugerować,

że u chorych na raka piersi leczonych terapią uzupełniającą istnieje wyższe ryzyko wystąpienia żylnych i tętniczych powikłań zakrzepowo-zatorowych.

3. Przedoperacyjna aktywność TF oraz stężenie PAI-1, a także stężenie t-PA po leczeniu są istotnie skorelowane z przyszłymi wynikami z klinicznymi związanymi z przeżyciem pacjentek. Wyższa przedoperacyjna aktywność TF i stężenie PAI-1 oraz wyższe stężenie t-PA po leczeniu istotnie zwiększają prawdopodobieństwo nawrotu raka piersi i śmierci spowodowanej ogólnoustrojową chorobą przerzutową.

## VI. Streszczenia

### Streszczenie w języku polskim

**CEL:** Celem pracy była próba określenia wartości prognostycznej wybranych czynników hemostatycznych, w tym elementów układu krzepnięcia: czynnika tkankowego (TF) i inhibitora szlaku czynnika tkankowego (TFPI) oraz fibrynolizy: tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), aktywatora plazminogenu typu urokinazy (u-PA) oraz inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1) u pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi oraz ocena wpływu zastosowanego leczenia uzupełniającego na ich stężenie i aktywność. Dodatkowo przeprowadzono analizę porównawczą wybranych czynników hemostatycznych w odniesieniu do parametrów demograficzno-antropometrycznych oraz kliniczno-patologicznych w obrębie badanej grupy zarówno przed leczeniem, jak i po leczeniu.

**MATERIAŁ I METODY:** W publikacji numer 1 badaniem o charakterze obserwacyjnym i prospektywnym objęto 41 kobiet w wieku 45-69 lat z rozpoznaniem pierwotnym, jednostronnym, inwazyjnym rakiem piersi bez przerzutów odległych. Pacjentki z populacji objętej badaniem obserwowano od momentu rozpoznania raka piersi do chwili nawrotu choroby nowotworowej lub zgonu. W ramach badania oceniono aktywność oraz stężenie podstawowych elementów układu fibrynolitycznego: t-PA, u-PA, PAI-1, PAI-1/t-PA oraz PAI-1/u-PA z wykorzystaniem techniki immunoenzymatycznej. W publikacji numer 2 badaniem objęto 60 pacjentek z pierwotnym, inwazyjnym rakiem piersi z medianą wieku 56 lat. W ramach badania oceniono aktywność i stężenie TF, TFPI, t-PA oraz PAI-1. Próbkę krwi od pacjentek pobrano dwukrotnie- 24 godziny przed planowaną operacją oraz 8 miesięcy po operacji usunięcia guza. W tym okresie pacjentki zostały poddane uzupełniającej terapii przeciwnowotworowej.

**WYNIKI:** Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej, w pierwszej publikacji przy wykorzystaniu krzywej ROC za najsilniejszy predyktor nawrotu choroby wśród badanych elementów fibrynolitycznych uznano t-PA, którego stężenie na poziomie 1,37 ng/ml ze swoistością 65,6% i czułością 88,9% uznano za najlepszą wartość odcięcia pozwalającą na odróżnienie pacjentek z nawrotem choroby od pacjentek bez nawrotu choroby nowotworowej. Wykorzystując analizę krzywych Kaplana-Meiera oraz test long-rank zaobserwowano, że pacjentki z aktywnością PAI-1 poniżej 3,04 U/ml charakteryzowały się znacząco dłuższym czasem przeżycia wolnym od choroby w porównaniu z pacjentkami



z aktywnością PAI-1 powyżej 3,04 U/ml. Z kolei w kontekście biomarkera t-PA, prawdopodobieństwo przeżycia bez nawrotu choroby nowotworowej było zdecydowanie niższe u pacjentek ze stężeniem t-PA poniżej 1,37 ng/ml lub 1,41 ng/ml (w zależności od zastosowanego punktu odcięcia - mediany lub indeksu Youdena). Zgodnie z wynikami analizy regresji Coxa, pacjentki ze stężeniem t-PA wyższym niż 1,41 ng/ml są o 90% mniej narażone na wystąpienie wznowy nowotworu piersi w porównaniu z pacjentkami z niższym stężeniem t-PA. **W drugiej publikacji** obszernie przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że skojarzona terapia uzupełniająca znacząco zwiększyła osoczowe stężenie TF i PAI-1, a także aktywność TF i TFPI, ale istotnie obniżyła stężenie t-PA. Dodatkowo, przy pomocy krzywej ROC zidentyfikowano, że przedoperacyjna aktywność TF z wartością odcięcia 13,32 U/ml oraz przedoperacyjne stężenie PAI-1 z wartością odcięcia 36,46 ng/ml stanowią najsilniejsze predyktory nawrotu choroby nowotworowej. W aspekcie porównania poszczególnych biomarkerów po leczeniu, najlepszym czynnikiem prognostycznym wznowy raka po leczeniu adjuwantowym okazał się t-PA, którego stężenie na poziomie 3,13 ng/ml ze swoistością 59,2% i czułością 90,9% może w sposób wiarygodny przewidzieć efekty leczenia chorych na raka piersi. Krzywe Kaplana-Meiera wykazały, że wysokie stężenie TF i PAI-1 przed leczeniem oraz wysoka aktywność TF przed leczeniem odpowiada istotnie krótszemu czasowi przeżycia wolnego od choroby oraz przeżycia całkowitego. Z kolei pacjentki z wyższym stężeniem antygeny t-PA po leczeniu charakteryzowały się gorszym rokowaniem w zakresie przeżycia wolnego od choroby oraz przeżycia całkowitego.

**WNIOSKI:** W ramach przeprowadzonych badań uzyskano wyniki potwierdzające istotny związek pomiędzy czynnikami hemostatycznymi a progresją raka piersi. Niniejsze badania udowodniły, że niskie wyjściowe stężenie t-PA w osoczu jest silnym czynnikiem prognostycznym przewidującym ryzyko nawrotu choroby nowotworowej. Dodatkowo, wykazano, że wyższa przedoperacyjna aktywność TF i stężenie PAI-1 oraz wyższe stężenie t-PA po leczeniu istotnie zwiększają prawdopodobieństwo nawrotu raka piersi i śmierci spowodowanej ogólnoustrojową chorobą przerzutową. Jako punkt kulminacyjny, zaobserwowano, że zastosowanie skojarzonego leczenia uzupełniającego u pacjentek z pierwotnym, jednostronnym nowotworem piersi zwiększyło osoczowe stężenie TF i PAI-1 oraz aktywność TF i TFPI, a jednocześnie obniżyło stężenie t-PA. Biorąc pod uwagę rolę biomarkerów hemostatycznych oraz nasilony wpływ leczenia przeciwnowotworowego na stan nadkrzepliwości i hipofibrynolizy, można sugerować, że u chorych na raka piersi leczonych

terapią uzupełniającą istnieje wyższe ryzyko wystąpienia żylnych i tętniczych powikłań zakrzepowo-zatorowych.

### **Streszczenie w języku angielskim**

**OBJECTIVE:** The aim of the study was to evaluate the prognostic value of selected hemostatic factors, including TF and TFPI and fibrinolysis: t-PA, u-PA and PAI-1 and the effect of adjuvant therapy on these coagulation and fibrinolysis components in invasive breast cancer. Additionally, a comparative analysis of selected hemostatic factors was performed in relation to demographic, anthropometric and clinicopathological parameters.

**MATERIAL AND METHODS:** In publication number 1, the observational and prospective study included 41 women aged 45-69 years diagnosed with primary, unilateral, invasive breast cancer without distant metastases. Patients in the study population were followed from breast cancer diagnosis to the date of breast cancer relapse or death. The study assessed the activity and concentration of the basic elements of the fibrinolytic system: t-PA, u-PA, PAI-1, PAI-1/t-PA and PAI-1/u-PA using the enzyme immunoassay technique. In publication number 2, the study included 60 patients with primary, invasive breast cancer with a median age of 56 years. The study assessed the activity and concentration of tissue factor (TF), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). Blood samples from the patients were collected twice - 24 hours before the planned surgery and 8 months after the tumor removal surgery. During this period, the patients underwent complementary anticancer therapy.

**RESULTS:** Based on the statistical analysis performed, **in the first publication** using the ROC curve, t-PA was considered to be the strongest predictor of disease recurrence among the tested fibrinolytic elements, with a concentration of 1.37 ng/ml with a specificity of 65.6% and a sensitivity of 88.9%. as the best cut-off value to distinguish patients with disease recurrence from patients without cancer recurrence. Using the analysis of Kaplan-Meier curves and the long-rank test, it was observed that patients with PAI-1 activity below 3.04 U/ml had a significantly longer disease-free survival compared to patients with PAI-1 activity above 3.04 U/ml. In turn, in the context of the t-PA biomarker, the probability of survival without cancer recurrence was significantly lower in patients with t-PA concentration below 1.37 ng/ml or 1.41 ng/ml (depending on the cut-off point used - median or Youden index). According to these Cox regression results, patients with a t-PA concentration higher than 1.41

ng/ml are 90% less likely to experience breast cancer recurrence compared to patients with a lower t-PA concentration. **In the second publication**, an extensive statistical analysis showed that combined adjuvant therapy significantly increased plasma TF and PAI-1 concentrations, as well as TF and TFPI activity, but significantly decreased t-PA concentrations. Additionally, using the ROC curve, it was identified that pre-operative TF activity with a cut-off value of 13.32 U/ml and pre-operative PAI-1 concentration with a cut-off value of 36.46 ng/ml were the strongest predictors of cancer recurrence. In terms of comparison of individual post-treatment biomarkers, t-PA turned out to be the best prognostic factor for cancer recurrence after adjuvant treatment. The t-PA level of 3.13 ng/ml with a specificity of 59.2% and a sensitivity of 90.9% could reliably predict the effects treatment of breast cancer patients. Kaplan-Meier curves showed that high pre-treatment TF and PAI-1 concentrations and high pre-treatment TF activity corresponded to significantly shorter disease-free and overall survival. In turn, patients with higher t-PA antigen concentration after treatment had a worse prognosis in terms of disease-free survival and overall survival.

**CONCLUSIONS:** The conducted research obtained results confirming a significant relationship between hemostatic factors and breast cancer progression. These studies have proven that low plasma t-PA concentration is a strong prognostic factor predicting the risk of cancer recurrence. Additionally, higher pre-operative TF activity and PAI-1 levels and higher post-treatment t-PA levels have been shown to significantly increase the probability of breast cancer recurrence and death from systemic metastatic disease. As a highlight, it was observed that the use of combined adjuvant therapy in patients with primary unilateral breast cancer increased the plasma concentrations of TF and PAI-1 and the activity of TF and TFPI, and at the same time decreased the concentration of t-PA. Taking into account the role of hemostatic biomarkers and the increased impact of anticancer treatment on hypercoagulability and hypofibrinolysis, it can be suggested that breast cancer patients treated with adjuvant therapy are at a higher risk of developing venous and arterial thromboembolic complication.

## VII. Bibliografia

1. Thornton P, Douglas J. Coagulation in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010;24(3):339–352.
2. Sánchez-Villegas A, Sánchez-Tainta A (red.). Virgin olive oil: A mediterranean diet essential. W: *The Prevention of Cardiovascular Disease through the Mediterranean Diet*. Academic Press, 2018.
3. Zaidi A, Green L. Physiology of haemostasis. *Anaesth Intensive Care Med* 2022;23(2):111–117.
4. Behrens A, Sikorski M, Kofinas P. Hemostatic strategies for traumatic and surgical bleeding. *Physiol Behav* 2014;102(11):4182–4194.
5. Vaiana CA, Leonard MK, Drummy LF, et al. Epidermal growth factor: Layered silicate nanocomposites for tissue regeneration. *Biomacromolecules* 2011;12(9):3139–3146.
6. Johnny JD. Hemostatic Disorders: Physiology, Diagnostics, and Management. *Clin J Oncol Nurs* 2021;25(4):379–382.
7. Doherty TM, Kelley A. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Bleeding Disorders - StatPearls - NCBI Bookshelf; [cytowane 11 września 2023]. Dostępny w: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541050/>.
8. Periyah MH, Halim AS, Saad AZM. Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in Hemostasis. *Int J Hematol Stem Cell Res* 2017;11(4):319–327.
9. Hemostasis, Surgical Bleeding, and Transfusion. W: Brunicki F, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, Pollock RE (red.), *Schwartz's Principles of Surgery*.
10. Golański JA. Struktura i funkcje układu hemostazy. W: Jastrzębska M (red.), *Diagnostyka laboratoryjna w hemostazie Diagnostyka laboratoryjna w hemostazie*. Oinpharma, 2009.
11. Mohammadi Aria M, Erten A, Yalcin O. Technology Advancements in Blood Coagulation Measurements for Point-of-Care Diagnostic Testing. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7(December):1–18.

12. Cleveland Clinic medical professional. Cleveland Clinic [Internet]. Hemostasis: Stages and How the Process Stops Blood Flow; [cytowane 14 września 2023]. Dostępny w: <https://my.clevelandclinic.org/health/symptoms/21999-hemostasis>.
13. Hajjar KA, Marcus AJ, Muller W. Vascular function in hemostasis. W: Kaushansky K, Prchal JT, Press OW, Lichtman MA, Levi M, Burns LJ, Caligiuri MA (red.), Williams Hematology, McGraw-Hill Education, 2016.
14. Monroe DM, Basic principles underlying coagulation. W: Key NS, Makris M, Lillicrap D (red.), Practical Hemostasis and Thrombosis, Wiley & Sons Inc., 2017.
15. Gentry P, Burgess H, Wood D, Hemostasis. W: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (red.), Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Elsevier Inc., 2008.
16. Wasilewski J, Kiljański T, Głowacki J. Geometryczny czynnik ryzyka i zaburzenia przepływu w procesie miażdżycowym. 2010;7(3):325–330.
17. BIO 381 Pathophysiology [Internet]. The Stages of Hemostasis; [cytowane 17 września 2023]. Dostępny w: [https://books.byui.edu/bio\\_381\\_pathophysiol/312\\_\\_the\\_stages\\_of\\_h](https://books.byui.edu/bio_381_pathophysiol/312__the_stages_of_h). DOI: 10.1007/978-3-642-40874-8\_2.
18. Wang XX, Liu Q, Sui JX, et al. Recent Advances in Hemostasis at the Nanoscale. *Adv Healthc Mater*;8(23). Epub ahead of print 1 December 2019. DOI: 10.1002/ADHM.201900823.
19. Garmo C, Bajwa T, Burns B. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Physiology, Clotting Mechanism - StatPearls - NCBI Bookshelf; [cytowane 17 września 2023]. Dostępny w: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507795/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29939572>.
20. Kumar V, Abbas AK, Aster J, Turner JR (red.). Hemodynamic Disorders, Thromboembolic Disease, and Shock. W: Robbins&Cotran Pathologic Basis of Disease, Elsevier Inc, 2021.
21. Zawilska K. Fizjologia hemostazy. W: Dmoszyńska A, Robak T, Hus I (red.), Podstawy hematologii, Wydawnictwo Czelej, 2015.

22. Korzonek-Szlacheta I, Hudzik B, Zubelewicz-Szkodzińska B, et al. Płytki krwi — ogniwo łączące zakrzepicę ze stanem zapalnym. *Folia Cardiol* 2018;13(4):303–308.
23. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: Bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol* 2013;35(3):254–261.
24. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, et al. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev* 2011;25(4):155–167.
25. Gale AJ. Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol* 2011;39(1):273–280.
26. DeLoughery TG (red.). Basics of Coagulation. W: Hemostasis and Thrombosis, Springer, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-19330-0.
27. Hosseinzadegan H, Tafti D. Mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemost Res* 2017;1(2):1008.
28. Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation testing in the core laboratory. *Lab Med* 2017;48(4):295–313.
29. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006;99(12):1293–1304.
30. Scridon A. Platelets and Their Role in Hemostasis and Thrombosis—From Physiology to Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*;23(21). Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3390/ijms232112772.
31. Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell Tissue Res* 2022;387(3):391–398.
32. Fullard JF. The Role of the Platelet Glycoprotein IIb / IIIa in Thrombosis and Haemostasis. *Curr Pharm Des* 2004;10(14):1567–1576.
33. Alshehri F, Alqahtani S, Alraizah A. The Biological Structure of Platelet and their Role with Subpopulations in Haemostasis. 2022;13(9):522.
34. Zheng Y, Wu J, Zhu Y, et al. Inorganic-based biomaterials for rapid hemostasis and wound healing. *Chem Sci* 2022;14(1):29–53.

35. Putri RA, Diansyah MN, Ashariati A, et al. Diathesis Hemorrhagic, Coagulation and Fibrinolytic System. *Biomol Heal Sci J* 2022;5(1):54–61.
36. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 2014;58(5):515.
37. Winter WE, Greene DN, Beal SG et al. Chapter two-Clotting factors: Clinical biochemistry and their roles as plasma enzymes. W: Makowski GS (red.), *Advances in Clinical Chemistry*, Elsevier, 2020. DOI: 10.1016/bs.acc.2019.07.008.
38. Bos M, Van'Veer C, Reitsma P. Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis. W: Kaushansky K, Prchal JT, Press OW, Lichtman MA, Levi M, Burns LJ, Caligiuri MA (red.), *Williams Hematology*, McGraw-Hill Education 2016.
39. Williams JL. Hemostasis: Secondary Hemostasis and Fibrinolysis. W: McKenzie SB, Landis-Piwowar K, Williams JL (red.), *Clinical Laboratory Hematology*, Pearson, 2020.
40. Halder M, Petsophonakul P, Akbulut AC, et al. Vitamin K: Double bonds beyond coagulation insights into differences between vitamin K1 and K2 in health and disease. *Int J Mol Sci* 2019;20(4):896.
41. Hao Z, Jin DY, Stafford DW, et al. Vitamin K-dependent carboxylation of coagulation factors: Insights from a cell-based functional study. *Haematologica* 2020;105(8):2164–2173.
42. O'Donnell JS, O'Sullivan JM, Preston RJS. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. *Br J Haematol* 2019;186(1):24–36.
43. Pablo-Moreno JAD, Serrano LJ, Revuelta L, et al. The Vascular Endothelium and Coagulation: Homeostasis, Disease, and Treatment, with a Focus on the Von Willebrand Factor and Factors VIII and V. *Int J Mol Sci* 2022;23(15):8283.
44. Boland JE, Connor DE. Coagulation and the coagulation cascade. W: Boland JE, Muller DWM (red.), W: *Interventional Cardiology and Cardiac Catheterisation: The Essential Guide*, Second Edition, CRC Press, 2019.

45. Sucker C, Zotz RB. The cell-based coagulation Model. In: Marcucci CE, Schoettker P (red.), Perioperative hemostasis: Coagulation for anesthesiologists, Springer, 2015.
46. Ferreira CN, Sousa MO, Dusse LMS, et al. A cell-based model of coagulation and its implications. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010;32(5):416–421.
47. Bahuleyan B. Hemostasis: A Cell Based Model. *J Physiol Pharmacol Adv* 2015;5(5):638–642.
48. McMichael M. New Models of Hemostasis. *Top Companion Anim Med* 2012;27(2):40–45.
49. Czupryński P, Wawrzynowicz-Syczewska M. Komórkowy model krzepnięcia. Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, Szczecin, Polska.
50. Orfeo T, Butenas S, Brummel-Ziedins K, et al. The tissue factor requirement in blood coagulation. *J Biol Chem* 2005;280(52):42887–42896.
51. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev* 2015;29(1):17–24.
52. Kołodziejczyk J, Wachowicz B. Zaburzenia fibrynolizy jako czynnik ryzyka zakrzepicy. *Pol Merkur Lek* 2009;27(160):341–345.
53. Wilson MR, Campbell Tait R. Hemostasis and Anticoagulants. W: Padmanabhan S (red.), Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine, Academic Press. 2014.
54. Lin H, Xu L, Yu S, et al. Therapeutics targeting the fibrinolytic system. *Exp Mol Med* 2020;52(3):367–379.
55. Gilabert-Estelles J, Castello R, Gilabert J, et al. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in endometriosis. *Front Biosci* 2005;10:1162–1176.
56. Medcalf R. What drives ‘fibrinolysis’? *Hamostaseologie* 2015;35(4):303–310.
57. Kołodziejczyk J, Ponczek MB. The role of fibrinogen, fibrin and fibrin(ogen) degradation products (FDPs) in tumor progression. *Wspolczesna Onkol* 2013;17(2):113–119.



58. Lam T, Medcalf RL, Cloud GC, et al. Tranexamic acid for haemostasis and beyond: does dose matter? *Thromb J* 2023;21:94.
59. Grobler C, Maphumulo SC, Grobbelaar LM, et al. Covid-19: The rollercoaster of fibrin(ogen), d-dimer, von willebrand factor, p-selectin and their interactions with endothelial cells, platelets and erythrocytes. *Int J Mol Sci* 2020;21(14):5168.
60. Hudson NE. Biophysical Mechanisms Mediating Fibrin Fiber Lysis. *Biomed Res Int* 2017;2017:2748340.
61. Ezihe-Ejiofor JA, Hutchinson N. Anticlotting mechanisms 1: Physiology and pathology. *Contin Educ Anaesthesia, Crit Care Pain* 2013;13(3):87–92.
62. Sira J, Eyre L. Physiology of haemostasis. *Anaesth Intensive Care Med* 2016;17(2):79–82.
63. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of Blood Coagulation by the Protein C Anticoagulant Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(7):1311–1320.
64. Stachowiak G, Stetkiewicz T, Polać I, et al. Rola inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1) po menopauzie – wpływ terapii hormonalnej tego okresu. *Przegląd Menopauzalny* 2005;16:17–21.
65. Zakrzewski M, Zakrzewska E, Kiciński P, et al. Evaluation of fibrinolytic inhibitors: Alpha-2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor 1 in patients with obstructive sleep apnoea. *PLoS One* 2016;11(11):e0166725.
66. Pechlivani N, Kearney KJ, Ajjan RA. Fibrinogen and antifibrinolytic proteins: Interactions and future therapeutics. *Int J Mol Sci* 2021;22(22):12537.
67. Hvas CL, Larsen JB. The Fibrinolytic System and Its Measurement: History, Current Uses and Future Directions for Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci* 2023;24(18):14179.
68. Lagrange J, Lecompte T, Knopp T, et al. Alpha-2-macroglobulin in hemostasis and thrombosis: An underestimated old double-edged sword. *J Thromb Haemost* 2022;20(4):806–815.
69. Place AE, Jin Huh S, Polyak K. The microenvironment in breast cancer progression: Biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res* 2011;13(6):227.

70. Chatterjee SJ, McCaffrey L. Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis. *Breast Cancer Targets Ther* 2014;6:15–27.
71. Feng Y, Spezia M, Huang S, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis* 2018;5(2):77–106.
72. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Breast Cancer: A Molecularly Heterogenous Disease Needing Subtype-Specific Treatments. *Med Sci* 2020;8(1):18.
73. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. *Am J Pathol* 2013;183(4):1113–1124.
74. Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization [Internet] World, 2020 [cytowane 21 listopada 2023]. Dostępny w: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>, data wejści.
75. Lei S, Zheng R, Zhang S, et al. Global patterns of breast cancer incidence and mortality: A population-based cancer registry data analysis from 2000 to 2020. *Cancer Commun* 2021;41(11):1183–1194.
76. Wojciechowska U, Barańska K, Michałek I, et al. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2020 roku. W: Krajowy Rejestr Nowotworów, Ministerstwo Zdrowia, Warszawa, 2022.
77. Angahar LT. An Overview of Breast Cancer Epidemiology, Risk Factors, Pathophysiology, and Cancer Risks Reduction. *MOJ Biol Med* 2017;1(4):92–96.
78. Zakhari S, Hoek JB. Epidemiology of moderate alcohol consumption and breast cancer: Association or causation? *Cancers (Basel)* 2018;10(10):349.
79. Buchholz TA, Wazer DE. Molecular biology and genetics of breast cancer development: A clinical perspective. *Semin Radiat Oncol* 2002;12(4):285–295.
80. Casali da Rocha JC. Carcinogenesis and Natural History of Breast Cancer. W: Novita G, Frasson A, Millen E, Zerwes F, Cavalcante F. (red.), Breast Diseases, Springer, 2019.
81. Centelles JJ. General Aspects of Colorectal Cancer. *ISRN Oncol* 2012;2012:139268.

82. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2015;1348(1):20–31.
83. Malarkey DE, Hoenerhoff M, Maronpot RR. Chapter 5 - Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations. W: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA (red.), Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition), Academic Press, 2013.
84. Weston A, Harris CC. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Multistage carcinogenesis [cytowane 22 listopada 2023]. Dostępny w: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>. DOI: 10.1007/978-1-61737-995-6\_2.
85. Uptodate [Internet]. Breast cancer development; [cytowane 22 listopada 2023]. Dostępny w: <https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=PI/53453>.
86. Nindrea RD, Aryandono T, Lazuardi L. Breast cancer risk from modifiable and non-modifiable risk factors among women in Southeast Asia: A meta-analysis. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2017;18(12):3201–3206.
87. Rodrigues de Bastos D. Risk factors related to breast cancer development. *Mastology* 2019;29(4):218–223.
88. Łukasiewicz S, Czeczelewski M, Forma A, et al. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies— An Updated Review. *Cancers (Basel)* 2021;13(17):4287.
89. Rakha E, Reis-Filho J, Baehner F, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 2010;12(4):207.
90. Malhotra GK, Zhao X, Band H, et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010;10(10):955–960.
91. Yampaka T, Noolek D. Data Driven for Early Breast Cancer Staging using Integrated Mammography and Biopsy. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2021;22(12):4069–4074.
92. Jassem J, Krzakowski M, Bobek-Billewicz B, et al. Breast cancer. *Oncol Clin Pr* 2020;16(5):207–260.
93. Hong R, Xu B. Breast cancer: an up-to-date review and future perspectives. *Cancer Commun* 2022;42(10):913–936.

94. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2022–2024. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2022.
95. Munien C, Viriri S. Classification of Hematoxylin and Eosin-Stained Breast Cancer Histology Microscopy Images Using Transfer Learning with EfficientNets. *Comput Intell Neurosci* 2021;2021:5580914.
96. Gomes do Nascimento R, Otoni KM. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology* 2020;30:e20200024.
97. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim* 2019;5:66.
98. Smolarz B, Zadrozna Nowak A, Romanowicz H. Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers (Basel)* 2022;14(10):2569.
99. Dei Tos AP. The role of the pathologist in the decision-making process. *Eur J Cancer, Suppl* 2013;11:23–26.
100. van Doonijeweert C, van Diest PJ, Ellis IO. Grading of invasive breast carcinoma: the way forward. *Virchows Arch* 2022;480(1):33–43.
101. Rakha EA, Tse GM, Quinn CM. An update on the pathological classification of breast cancer. *Histopathology* 2023;82(1):5–16.
102. Baranova A, Krasnoselskyi M, Starikov V, et al. Triple-negative breast cancer: current treatment strategies and factors of negative prognosis. *J Med Life* 2022;15(2):153–161.
103. Afifi N, Barrero CA. Understanding breast cancer aggressiveness and its implications in diagnosis and treatment. *J Clin Med* 2023;12(4):1375.
104. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, et al. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;107(3):309–330.
105. Johnson KS, Conant EF, Soo MS. Molecular subtypes of breast cancer: A review for breast radiologists. *J Breast Imaging* 2021;3(1):12–24.
106. Onkonet.pl [Internet]. Metody leczenia raka i nowotworów złośliwych; [cytowane 28 listopada 2023]. Dostępny w: [https://www.onkonet.pl/dp\\_infoslec.php](https://www.onkonet.pl/dp_infoslec.php).

107. Czajka ML, Pfeifer C. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Breast cancer surgery; [cytowane 28 listopada 2023]. Dostępny w: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553076/>.
108. Holland K. Healthline.com [Internet]. Types of mastectomies and meconstruction surgery; 31 sierpnia 2021 [cytowane 28 listopada 2023]. Dostępny w: <https://www.healthline.com/health/breast-cancer/mastectomy-pictures>.
109. Lazaraviciute G, Chaturvedi S. Mastectomy-A Critical Review. *Open J Clin Diagnostics* 2017;7(2):58–66.
110. Ryś J, Wysocki WM, Chmielik E, et al. Rodzaje operacji wykonywanych u chorych na raka piersi i zasady zabezpieczania materiału tkankowego do badania histologicznego. *Polish J Pathol* 2011;4(4):20–25.
111. Pol.onkol.kielce.pl [Internet]. Metody chirurgiczne w leczeniu raka piersi; [cytowane 28 listopada 2023]. Dostępny w: <https://pol.onkol.kielce.pl/dla-pacjenta/rak-piersi>.
112. Nowecki ZI, Jeziorski A. Chirurgiczne leczenie zmian nowotworowych piersi. *Onkol Prakt Klin Edu* 2017;3(3):93–153.
113. Winstead E. Cancer.gov [Internet]. Breast cancer surgery choice may affect young survivors' quality of life; [cytowane 28 listopada 2023]. Dostępny w: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2021/breast-cancer-mastectomy-quality-of-life>.
114. Bauer A. Radiation Treatment for Breast Cancer. *Surg Clin North Am* 2023;103:187–199.
115. Hennequin C, Belkacémi Y, Bourgier C, et al. Radiotherapy of breast cancer. *Cancer/Radiotherapie* 2022;26:221–230.
116. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician* 2010;81(11):1339–1346.
117. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, et al. Clinical diagnosis and management of breast cancer. *J Nucl Med* 2016;57:9–16.

118. Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Cancer Chemotherapy; [cytowane 29 listopada 2023]. Dostępny w: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>.
119. Traves KP, Cokenakes SE. Treatment Cancer Breast. *Am Fam Physician* 2021;104(2):171–178.
120. Tremont A, Lu J, Cole JT. Endocrine therapy for early breast cancer. *Ochsner J* 2017;17:405–411.
121. Lumachi F, Luisetto G, Basso S, et al. Endocrine therapy of breast cancer. *Curr Med Chem* 2011;18:513–522.
122. Jordan VC, O'Malley BW. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(36):5815–5824.
123. Chang BY, Kim SA, Malla B, et al. The effect of selective estrogen receptor modulators (serms) on the tamoxifen resistant breast cancer cells. *Toxicol Res* 2011;27(2):85–93.
124. Medycyna Praktyczna.pl [Internet]. Tamoksyfen; [cytowane 29 listopada 2023]. Dostępny w: <https://www.mp.pl/pacjent/leki/subst.html?id=764>.
125. Johnston SRD, Dowsett M. Aromatase inhibitors for breast cancer: Lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer* 2003;3(11):821–831.
126. Meisel JL, Venur VA, Gnant M, et al. Evolution of targeted therapy in breast cancer: where precision medicine began. *ASCO Educ B* 2018;38(38):78–86.
127. Schneble E, Jinga D-C, George J, et al. Breast cancer immunotherapy. *Maedica A J Clin Med* 2015;10(2):185–191.
128. Cancer.org [Internet]. Immunotherapy for breast cancer; [cytowane 30 listopada 2023]. Dostępny w: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/immunotherapy.html>. DOI: 10.1056/nejmoa1809615.
129. Breastcancer.org [Internet]. Immunotherapy; [cytowane 30 listopada 2023]. Dostępny w: <https://www.breastcancer.org/treatment/immunotherapy>.

130. Moik F, Ay C. Hemostasis and cancer: Impact of haemostatic biomarkers for the prediction of clinical outcomes in patients with cancer. *J Thromb Haemost* 2022;20(12):2733–2745.
131. Lal I, Dittus K, Holmes CE. Platelets, coagulation and fibrinolysis in breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2013;15(4):207.
132. Boccaccio C, Comoglio PM. A functional role for hemostasis in early cancer development. *Cancer Res* 2005;65(19):8579–8582.
133. Chojnowski K, Treliński J. Profilaktyka żylniej choroby zakrzepowo-zatorowej u chorych na nowotwory złośliwe. *Onkol w Prakt Klin* 2012;8(3):105–112.
134. Singla T, Singla G, Ranga S, et al. Role of platelet aggregation in metastatic breast cancer patients. *Corresp Análisis* 2020;63(4):564–569.
135. Schwab M (red.). *Encyclopedia of cancer*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
136. Strassenburg W, Jóźwicki J, Durślewicz J, et al. Tumor Cell-Induced Platelet Aggregation as an Emerging Therapeutic Target for Cancer Therapy. *Front Oncol* 2022;12:909767.
137. Lavergne M, Janus-Bell E, Schaff M, et al. Platelet Integrins in Tumor Metastasis: Do They Represent a Therapeutic Target? *Cancers (Basel)* 2017;9(10):133.
138. Smeda M, Przyborowski K, Stojak M, et al. The endothelial barrier and cancer metastasis: Does the protective facet of platelet function matter? *Biochem Pharmacol* 2020;176:113886.
139. Khan UT, Walker AJ, Baig S, et al. Venous thromboembolism and mortality in breast cancer: Cohort study with systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2017;17(1):747.
140. Fernandes CJ, Morinaga LTK, Alves JL, et al. Cancer-associated thrombosis: the when, how and why. *Eur Respir Rev* 2019;28:180119.
141. Razak N, Jones G, Bhandari M, et al. Cancer-associated thrombosis: An overview of mechanisms, risk factors, and treatment. *Cancers (Basel)* 2018;10(10):380.

142. Li X, Cao D, Zheng X, et al. Tissue factor as a new target for tumor therapy—killing two birds with one stone: a narrative review. *Ann Transl Med* 2022;10(22):1250–1250.
143. Rondon AMR, Kroone C, Kapteijn MY, et al. Role of tissue factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2019;45(4):396–412.
144. Giordano C, Camera G La, Gelsomino L, et al. The Biology of Exosomes in Breast Cancer Progression: Dissemination, Immune Evasion and Metastatic Colonization. *Cancers (Basel)* 2020;12(8):2179.
145. Malik M. Influence of microvesicles in breast cancer metastasis and their therapeutic implications. *Arch Iran Med* 2015;18(3):189–192.
146. Hisada Y, Mackman N. Tissue Factor and Extracellular Vesicles: Activation of Coagulation and Impact on Survival in Cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13(15):3839.
147. Hisada Y, Mackman N. Cancer cell-derived tissue factor-positive extracellular vesicles: Biomarkers of thrombosis and survival. *Curr Opin Hematol* 2019;26(5):349–356.
148. Monroe DM, Hoffman M. Dysregulation of hemostasis by cancer. *Cancer Treat Res* 2009;148:3–15.
149. Bluff JE, Brown NJ, Reed MWR, et al. Tissue factor , angiogenesis and tumour progression. 2008;10:1–10.
150. Koizume S, Miyagi Y. Breast cancer phenotypes regulated by tissue factor-factor VII pathway: Possible therapeutic targets. *World J Clin Oncol* 2014;5(5):908–920.
151. Jabłońska K, Witkiewicz W, Dzięgiel P. Rola czynnika tkankowego w angiogenezie i progresji nowotworów. *Postępy Biol Komórki* 2013;40(1):21–38.
152. Liang J, Oyang L, Rao S, et al. Rac1 , A Potential Target for Tumor Therapy. 2021;11:674426.
153. Hempel D, Sierko E, Wojtukiewicz MZ. Receptory aktywowane przez proteazy – biologia i rola w nowotworach złośliwych. *Postep Hig Med Dosw* 2016;70:775–786.
154. Hernández NA, Correa E, Avila EP, et al. PAR1 is selectively over expressed in high grade breast cancer patients : a cohort study. *J Transl Med* 2009;7:47.



155. Zhao D, Qiao J, He H, et al. TFPI2 suppresses breast cancer progression through inhibiting TWIST-integrin  $\alpha 5$  pathway. *Mol Med*;26(1). Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1186/s10020-020-00158-2.
156. Xu C, Wang H, He H, et al. Low expression of TFPI-2 associated with poor survival outcome in patients with breast cancer. *BMC Cancer* 2013;13:118.
157. Hassan N, Efig J, Kiesel L, et al. The Tissue Factor Pathway in Cancer : Overview and Role of Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cancers (Basel)* 2023;15:1524.
158. Łojko A, Zawilska K, Grodecka-Gazdecka S, et al. Zaburzenia hemostazy a nasilenie procesu neoangiogenezy u chorych na raka piersi. *Współczesna Onkol Onkol* 2006;10(10):515–520.
159. Kołodziejczyk J, Wachowicz B. Rola układu fibrynolitycznego w progresji nowotworów. *Postępy Nauk Med* 2010;6:509–514.
160. Roszkowski K, Ziółkowska E. Fibrynliza w procesie nowotworowym. *Współczesna Onkol* 2005;9(5):196–198.
161. Heissig B, Eiamboonsert S, Salama Y, et al. Cancer therapy targeting the fibrinolytic system. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;99:172–179.
162. Mahmood N, Rabbani SA. Fibrinolytic system and cancer: Diagnostic and therapeutic applications. *Int J Mol Sci* 2021;22(9):4358.
163. Binder BR, Mihaly J. The plasminogen activator inhibitor 'paradox' in cancer. *Immunol Lett* 2008;118(2):116–124.
164. Duffy MJ. The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in Malignancy. *Curr Pharm Des* 2004;10(1):39–49.
165. Mahmood N, Mihalcioiu C, Rabbani SA. Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): Diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. *Front Oncol* 2018;8:24.
166. Kwaan HC, Lindholm PF. Fibrin and fibrinolysis in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2019;45(4):413–422.

167. Kwaan HC, Mazar AP, McMahon BJ. The apparent uPA/PAI-1 paradox in cancer: More than meets the eye. *Semin Thromb Hemost* 2013;39(4):382–391.
168. Alfieri M, Meo L, Ragno P. Posttranscriptional Regulation of the Plasminogen Activation System by Non-Coding RNA in Cancer. *Int J Mol Sci* 2023;24(2):962.
169. Fortenberry YM, Brandal SM, Carpentier G, et al. Intracellular expression of PAI-1 specific aptamers alters breast cancer cell migration, invasion and angiogenesis. *PLoS One* 2016;11(10):e0164288.
170. Kubala MH, DeClerck YA. The Plasminogen Activator Inhibitor-1 Paradox in Cancer: A Mechanistic Understanding. *Cancer Metastasis Rev* 2019;38(3):483–492.
171. Balsara RD, Ploplis VA. Plasminogen Activator Inhibitor-1: The Double Edged Sword in Apoptosis. *Thromb Haemost* 2008;100(6):1029–1036.
172. Placencio VR, DeClerck YA. Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cancer: Rationale and Insight for Future Therapeutic Testing. *Cancer Res* 2015;75(15):2969–2974.
173. Plas E, Carroll VA, Jilch R, et al. Variations of components of the plasminogen activation system with the cell cycle in benign prostate tissue and prostate cancer. *Cytometry* 2001;46(3):184–189.
174. Thielemann A, Baszczuk A, Kopczyński Z, et al. Stężenie tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) u chorych na raka gruczołu piersiowego. *Diagnostyka Lab* 2012;48(2):173–179.
175. Costanzo S, Parisi R, De Curtis A, et al. Tissue Plasminogen Activator Levels and Risk of Breast Cancer in a Case-Cohort Study on Italian Women: Results from the Moli-sani Study. *Thromb Haemost* 2021;121(4):449–456.
176. Ortiz-Zapater E, Peiró S, Roda O, et al. Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. *Am J Pathol* 2007;170(5):1573–1584.

177. Ruszkowska-Ciastek B, Kwiatkowska K, Bielawska S, et al. Evaluation of the prognostic value of fibrinolytic elements in invasive breast carcinoma patients. *Neoplasma* 2020;67(5):1146–1156.
178. Duan P, Ni C. T-PA stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/p38 signaling pathways. *Pharmazie* 2014;69(1):70–75.
179. Qiu Y, Wang H, Guo Q, et al. CD44s-activated tPA/LRP1-NFκB pathway drives lamellipodia outgrowth in luminal-type breast cancer cells. *Front Cell Dev Biol* 2023;11:1224827.
180. Corte MD, Vérez P, Rodríguez JC, 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.
181. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, et al. UPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: Validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res* 2014;16(4):428.
182. Nicolini A, Ferrari P, Duffy MJ. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Semin Cancer Biol* 2018;52:56–73.
183. Harms W, Malter W, Kramer S, et al. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) for metastatic sentinel lymph node involvement in breast cancer. *Anticancer Res* 2014;34:4457–4462.
184. De Witte JH, Sweep CGJ, Klijn JGM, et al. Prognostic value of tissue-type plasminogen activator (tPA) and its complex with the type-1 inhibitor (PAI-1) in breast cancer. *Br J Cancer* 1999;80(1/2):286–294.
185. Bharadwaj AG, Holloway RW, Miller VA, et al. Plasmin and plasminogen system in the tumor microenvironment: Implications for cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Cancers (Basel)* 2021;13(8):1838.
186. Nasser NJ, Fox J, Agbarya A. Potential mechanisms of cancer-related hypercoagulability. *Cancers (Basel)* 2020;12(3):566.

187. Falanga A. Mechanisms of hypercoagulation in malignancy and during chemotherapy. *Pathophysiol Haemost Thromb* 1998;28(3):50–60.
188. Haddad T, Greeno E. Chemotherapy-induced thrombosis. *Thromb Res* 2006;118(5):555–568.
189. Serra R, Buffone G, Miglietta AM, et al. Breast cancer and venous disease: A retrospective cohort study. *Ann Vasc Surg* 2013;27(6):762–766.

## VIII. Spis rycin

|   |    |
|---|----|
| <b>Rycina 1.</b> Fizjologia procesu hemostazy (w modyfikacji własnej).....  | 10 |
| <b>Rycina 2.</b> Udział ściany naczyniowej w procesie hemostazy (w modyfikacji własnej).....  | 12 |
| <b>Rycina 3.</b> Proces hemostazy płytkowej (w modyfikacji własnej). ....   | 15 |
| <b>Rycina 4.</b> Tradycyjny model kaskady krzepnięcia (w modyfikacji własnej). ....   | 18 |
| <b>Rycina 5.</b> Komórkowy model aktywacji krzepnięcia (w modyfikacji własnej). ....  | 21 |
| <b>Rycina 6.</b> Fizjologia procesu fibrynolizy (w modyfikacji własnej).....  | 23 |
| <b>Rycina 7.</b> Elementy zapewniające równowagę procesu hemostazy (w modyfikacji własnej). ....  | 24 |
| <b>Rycina 8.</b> Anatomia piersi oraz patofizjologia raka piersi na poziomie histologicznym i molekularnym (w modyfikacji własnej)..... | 32 |
| <b>Rycina 9.</b> Rozpoznanie i klasyfikacja raka piersi.....  | 34 |
| <b>Rycina 10.</b> Różnica pomiędzy chirurgią oszczędzającą pierś a mastektomią całkowitą (w modyfikacji własnej).....                   | 45 |
| <b>Rycina 11.</b> Mechanizm działania SERM oraz AI stosowanych w leczeniu raka piersi (w modyfikacji własnej).....                      | 49 |
| <b>Rycina 12.</b> Molekularne mechanizmy działania elementów krzepnięcia w progresji raka piersi (w modyfikacji własnej).....           | 62 |
| <b>Rycina 13.</b> Kluczowe mechanizmy elementów fibrynolizy w progresji raka piersi (w modyfikacji własnej).....                        | 69 |

## IX. Spis tabel

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Fizjologiczne szlaki trzech różnych typów hemostazy.....                                    | 9  |
| <b>Tabela 2.</b> Modyfikowalne i niemodyfikowalne czynniki ryzyka raka piersi. ....                          | 33 |
| <b>Tabela 3.</b> Uproszczona klasyfikacja histologiczna raka piersi według wytycznych WHO z 2019 r.<br>..... | 36 |
| <b>Tabela 4.</b> Ocena stopnia złośliwości histologicznej raka piersi.....                                   | 37 |
| <b>Tabela 5.</b> Klasyfikacja oceny stopnia zaawansowania .....  | 38 |
| <b>Tabela 6.</b> Charakterystyka molekularnych podtypów raka piersi.....                                     | 42 |
| <b>Tabela 7.</b> Rodzaje cytostatyków stosowanych w chemioterapii raka piersi.....                           | 47 |
| <b>Tabela 8.</b> Schemat i dawkowanie chemioterapii w leczeniu raka piersi.....                              | 48 |

## X. 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 Ruszkowska-Ciastek**  
Katedra Patofizjologii  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie:

- prof. dr hab. n. med. D. Rość, dr n. med. B. Ruszkowska-Ciastek,  
dr n. med. P. Rhone, dr n. med. K. 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 rozpoznanym rakiem sutka wczesnej fazy. ”**

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

#### **Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku**

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

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

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

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

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

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

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

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

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

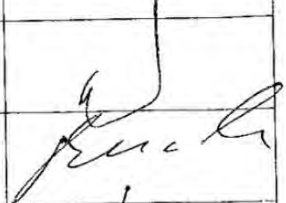
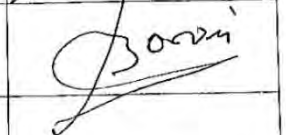

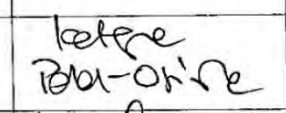
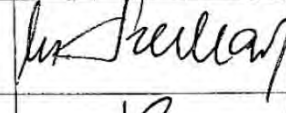
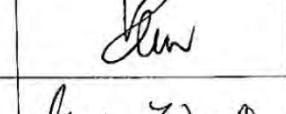
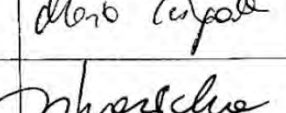
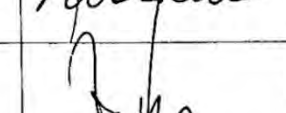
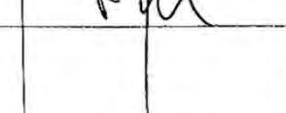
Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

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



**Lista obecności**  
**na posiedzeniu Komisji Bioetycznej**  
**w dniu 16.06.2015 r.**

| Lp. | Imię i nazwisko                                      | Funkcja               | Podpis  |
|-----|--|-----------------------|---|
| 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 Ziemniarska                          |                       |   |

## XI. Oświadczenia o współautorstwie

*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 14.12.2023 r.

Dr hab. Artur Słomka, 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 Wrzeszcz K, Słomka A, Zarychta E, Rhone P, Ruszkowska-Ciastek B. Tissue plasminogen activator as a possible indicator of breast cancer relapse: a preliminary, prospective study. J Clin Med. 2022; 11(9): 2398; mój udział polegał na wstępnej analizie wyników oraz wstępnej weryfikacji treści manuskryptu. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.



(podpis)

Bydgoszcz, dnia 14.12.2023 r.

Dr n. med. Elżbieta Zarychta  
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 Wrzeszcz K, Słomka A, Zarychta E, Rhone P, Ruszkowska-Ciastek B. Tissue plasminogen activator as a possible indicator of breast cancer relapse: a preliminary, prospective study. J Clin Med. 2022; 11(9): 2398; mój udział polegał na wstępnej analizie wyników. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.

  
.....  
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 14.12.2023 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 Wrzeszcz K, Słomka A, Zarychta E, Rhone P, Ruskowska-Ciastek B. Tissue plasminogen activator as a possible indicator of breast cancer relapse: a preliminary, prospective study. J Clin Med. 2022; 11(9): 2398; 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)

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 14.12.2023 r.

Dr hab. Barbara Ruskowska-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 Wrzeszcz K, Słomka A, Zarychta E, Rhone P, Ruskowska-Ciastek B. Tissue plasminogen activator as a possible indicator of breast cancer relapse: a preliminary, prospective study. J Clin Med. 2022; 11(9): 2398; mój udział polegał na krytycznej weryfikacji wyników oraz na ocenie merytorycznej sporządzonego manuskryptu. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.

*Barbara Ruskowska-Ciastek*  
.....  
(podpis)

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 14.12.2023 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 Wrzeszcz K, Rhone P, Kwiatkowska K, Ruszkowska-Ciastek B. Hypercoagulability state combined with post-treatment hypofibrinolysis in invasive breast cancer: a seven-year follow-up evaluating disease-free and overall survival. Life. 2023; 13(5): 1106; 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)



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 14.12.2023 r.

Mgr Katarzyna Kwiatkowska  
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 Wrzeszcz K, Rhone P, Kwiatkowska K, Ruszkowska-Ciastek B. Hypercoagulability state combined with post-treatment hypofibrinolysis in invasive breast cancer: a seven-year follow-up evaluating disease-free and overall survival. Life. 2023; 13(5): 1106; mój udział polegał na wstępnej obróbce materiału biologicznego. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.

*Kwiatkowska Katarzyna*  
.....  
(podpis)

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 14.12.2023 r.

Dr hab. Barbara Ruskowska-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 Wrzeszcz K, Rhone P, Kwiatkowska K, Ruskowska-Ciastek B. Hypercoagulability state combined with post-treatment hypofibrinolysis in invasive breast cancer: a seven-year follow-up evaluating disease-free and overall survival. Life. 2023; 13(5): 1106; mój udział polegał na krytycznej weryfikacji wyników, ocenie merytorycznej sporządzonego manuskryptu oraz przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 15%.

*Barbara Ruskowska-Ciastek*  
.....  
(podpis)