



Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

DZIEDZINA NAUK MEDYCZNYCH I NAUK O ZDROWIU

DYSCYPLINA NAUKI MEDYCZNE

ROZPRAWA DOKTORSKA

Ocena stężenia i przydatności diagnostycznej wybranych chemokin z rodziny CXC oraz ich receptorów w osoczu chorych na raka piersi o podtypie luminalnym A lub luminalnym B

Joanna Motyka

Promotor: prof. dr hab. Sławomir Ławicki

Promotor pomocniczy: dr n. med. Ewa Gacuta

Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych

Kierownik jednostki: prof. dr hab. Karol Adam Kamiński

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach kształcenia
w Szkole Doktorskiej UMB

Białystok, 2023

Pragnę złożyć podziękowania Panu prof. dr hab. Sławomirowi Ławickiemu za przekazaną wiedzę, cierpliwość oraz wszechstronną pomoc podczas każdego z etapów powstawania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Serdeczne podziękowania kieruję także do Pani mgr Aleksandry Kicman oraz Pani mgr Moniki Kuleszy za nieocenioną pomoc w badaniach oraz za wspólnie spędzony czas podczas naukowej podróży.

Chcę również podziękować całemu Zakładowi Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych oraz zespołowi projektu Białystok PLUS za 4 lata współpracy oraz wspólnie spędzonego czasu.

Wreszcie dziękuję wszystkim Osobom, które w nawet najmniejszym stopniu przyczyniły się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej służąc dobrą radą oraz wsparciem.

Spis treści

Rozdział 1. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej oraz zestawienie publikacji doktoranta.....	6
Rozdział 2. Wprowadzenie	7
2.1. Nowotwory piersi.....	7
2.1.1. Epidemiologia i diagnostyka raka piersi	7
2.1.2. Podział raka piersi ze względu na stopień zaawansowania.....	8
2.1.3. Podział molekularny raka piersi.....	9
2.1.4. Podtypy luminalny A oraz luminalny B raka piersi	9
2.2. Chemokiny i ich receptory	10
2.2.1. Funkcje biologiczne chemokin.....	11
2.2.2. Rola chemokin w nowotworach.....	11
2.2.3. Charakterystyka wybranych chemokin i ich receptorów w nowotworach piersi.....	11
2.2.3.1. CXCL1	11
2.2.3.2. CXCL8.....	13
2.2.3.3. CXCL12 i receptor CXCR4	15
Rozdział 3. Cel pracy	19
Rozdział 4. Realizacja celów naukowych	21
4.1. Omówienie publikacji 1. Motyka J., Kicman A., Kulesza M., Ławicki S. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients. <i>Cancers</i> , 2023, 15(12), 3118.....	21
4.2. Omówienie publikacji 2. Motyka J., Gacuta E., Kicman A., Kulesza M., Ławicki P., Ławicki S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. <i>Journal of Clinical Medicine</i> , 2022, 11(22), 6694.....	23
4.3. Omówienie publikacji 3. Motyka J., Gacuta E., Kicman A., Kulesza M., Malinowski P., Ławicki S. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer. <i>Cancer Management and Research</i> , 2023, 15, 573-589.....	24
Rozdział 5. Wnioski.....	27
Rozdział 6. Bibliografia	28
Rozdział 7. Streszczenie	34
7.1. Streszczenie w języku polskim	34
7.2. Streszczenie w języku angielskim.....	36
Rozdział 8. Publikacja 1. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients	38
Rozdział 9. Publikacja 2. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer.....	54
Rozdział 10. Publikacja 3. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer	75

Rozdział 11. Zgoda Komisji Bioetycznej	93
Rozdział 12. Oświadczenia autora rozprawy doktorskiej	96
Rozdział 13. Oświadczenia współautora rozprawy doktorskiej.....	99
Rozdział 14. Dorobek naukowy	106
14.1. Wykaz publikacji stanowiących Rozprawę doktorską.....	106
14.2. Wykaz innych publikacji naukowych	106
14.2.1. W czasopismach posiadających nadany IF:	106
14.2.2. W czasopismach i wydawnictwach nieposiadających nadanego IF:	107
14.3. Wykaz rozdziałów w monografii:	107
14.4. Wykaz doniesień zjazdowych:	108
14.5. Wykaz innych aktywności naukowych:	111

Rozdział 1.

Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej oraz zestawienie publikacji doktoranta

Niniejsza praca doktorska jest składową trzech prac, tj. jednej pracy pogładowej oraz dwóch prac oryginalnych. Artykuły zostały opublikowane na łamach zagranicznych czasopism naukowych, posiadających wysokie wskaźniki IF oraz punktację MNiSW, co przedstawiono poniżej.

Publikacja 1. Motyka J, Kicman A, Kulesza M, Ławicki S. *CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients*. *Cancers* (Basel). 2023;15(12):3118. doi:10.3390/cancers15123118 (praca przeglądowa)

IF: 5.200; MNiSW: 200 punktów

Publikacja 2. Motyka, J., Gacuta, E., Kicman, A., Kulesza, M., Ławicki, P., Ławicki, S. *Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer*. *Journal of Clinical Medicine*, 2022, 11(22), 6694. <https://doi.org/10.3390/jcm11226694> (praca oryginalna)

IF: 3.900; MNiSW: 140 punktów

Publikacja 3. Motyka, J., Gacuta, E., Kicman, A., Kulesza, M., Malinowski, P., Ławicki, S. *CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer*. *Cancer Management and Research*, 2023, 15, 573–589. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S416382> (praca oryginalna)

IF: 3.300; MNiSW: 140 punktów

Zestawienie publikacji doktoranta

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	12.400	480.000
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	6	20.928	700.000
Streszczenia zjazdowe	29	-	-
Razem	38	33.328	1180.000

Rozdział 2.

Wprowadzenie

Nowotwór piersi jest chorobą wysoce heterogenną, gdyż charakteryzuje się dużą różnorodnością histopatologiczną i molekularną, a także różnego stopnia zróżnicowaniem komórek. Najczęściej objawia się jako wyczuwalna zmiana w piersi. Do innych, rzadziej występujących objawów należą ściągnięcie lub pociągnięcie skóry nad zmianą, wciągnięcie lub wyciek z brodawki sutkowej, a rzadziej zmiana wielkości piersi lub koloru skóry oraz powiększenie pachowych węzłów chłonnych (w tym także zajęcie węzłów chłonnych przy jednoczesnym braku objawów ze strony piersi). Tego typu objawy nie są charakterystyczne dla zmiany złośliwej i mogą również występować w przypadku zmian łagodnych, stąd do pełnej identyfikacji toczącego się procesu nowotworowego konieczne jest przeprowadzenie badań zarówno obrazowych, jak i histologicznych opartych o biopsję tkankową [1].

2.1. Nowotwory piersi

Nowotwory złośliwe piersi można podzielić na dwie główne grupy - raki i mięsaki. Szacuje się, że raki są najczęstszymi nowotworami piersi i wywodzą się z komórek nabłonkowych zrazikowych lub przewodowych piersi [2]. W grupie raków, w zależności od stopnia inwazji okolicznych tkanek przez komórki nowotworowe, wyróżnia się trzy dodatkowe podgrupy: zmiany *in situ* (zmiany nieinwazyjne lub przedinwazyjne), zmiany inwazyjne (naciekające otaczającą tkankę zrębu piersi) oraz zmiany przerzutowe. Inwazyjne raki piersi stanowią około 90-95% wszystkich diagnozowanych przypadków, przy czym inwazyjny rak przewodowy jest najczęstszym typem histologicznym raka piersi (50-80% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów) [2,3].

2.1.1. Epidemiologia i diagnostyka raka piersi

Rak piersi pozostaje najbardziej rozpowszechnionym nowotworem na świecie. Według danych WHO z bazy danych GLOBOCAN, globalna zachorowalność w 2020 roku osiągnęła ponad 2,2 miliona nowych przypadków, przy wskaźniku śmiertelności utrzymującym się wokół 685 tysięcy zgonów w ciągu roku [4]. W zależności od stadium zaawansowania choroby w momencie diagnozy, śmiertelność z powodu raka piersi znacząco się różni. Szacowany okres 5-letniego przeżycia pacjentów w przypadku przerzutującego do odległych

loci raka piersi wynosi poniżej 30%, podczas gdy w przypadku zmiany zlokalizowanej, współczynnik ten wzrasta aż do ponad 99% [5,6]. Powyższe statystyki wyraźnie pokazują istotę wczesnej diagnostyki chorób nowotworowych, aby możliwie szybko zapobiec rozprzestrzenianiu się komórek nowotworowych poza pierwotną lokalizację guza. Dlatego też wiele badań koncentruje się na poszukiwaniu nowych potencjalnych markerów nowotworowych, które pozwoliłyby na usprawnienie procesu diagnostycznego wczesnego rozpoznania raka piersi.

Wstępna diagnostyka raka piersi opiera się na samobadaniu przez pacjentki gruczołów piersiowych oraz okresowych badaniach przesiewowych w grupie kobiet o podwyższonym ryzyku zachorowania. Wdrożenie mammografii przesiewowej przez wiele krajów na całym świecie w grupach kobiet o podwyższonym ryzyku zachorowania na raka piersi (w Polsce jest to grupa kobiet w wieku powyżej 50-ciu lat) było przełomem w usprawnieniu procesu diagnostycznego, pozwalającego na wyłapanie z populacji wczesnych podejrzanych zmian, które w dalszym badaniu okazywały się być zmianami złośliwymi [7,8].

Oprócz badania mammograficznego, obecne metody diagnostyczne opierają się głównie na metodach obrazowania, takich jak ultrasonografia, tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny czy pozytonowa tomografia emisyjna. Metody obrazowania mają jednak swoje ograniczenia. Głównym z nich jest diagnostyka małych rozmiarów zmian w piersi, gdzie trudnym jest jednoznaczne określenie jej charakteru. Dodatkowo też u kobiet z zachowaną cykliczną czynnością hormonalną występują dodatkowe trudności rozpoznania ze względu na okresowe zmiany gęstości piersi. Dlatego też każde badanie obrazowe wymaga poparcia badaniem klinicznym pacjentki oraz musi ostatecznie opierać się na ocenie histopatologicznej [1].

2.1.2. Podział raka piersi ze względu na stopień zaawansowania

Obecnie obowiązująca 8 edycja wytycznych *American Joint Committee on Cancer* zawiera dwa systemy oceny zaawansowania obejmujące ocenę anatomiczną – klasyfikację TNM (ocena wielkości guza pierwotnego, stanu węzłów i przerzutów odległych) oraz ocenę prognostyczną (stopień zaawansowania guza, ekspresja receptorów hormonalnych i onkogenów, wyniki panelu wielogenowego) [9,10]. W przypadku zmian w piersi stopień zaawansowania TNM ma zastosowanie do raków inwazyjnych i raków przewodowych *in situ*. Zarówno anatomiczna, jak i prognostyczna ocena stopnia zaawansowania jest preferowana w postępowaniu z pacjentami, jednak sama anatomiczna ocena stopnia zaawansowania może

być zarówno stosowana w regionach świata, w których testy biomarkerów nie są dostępne [9].

Klasyfikacja anatomiczna TNM ocenia stopień zaawansowania choroby biorąc pod uwagę wielkość guza pierwotnego (Tis do T4), stan regionalnych węzłów chłonnych (N0 do N3) oraz obecność przerzutów odległych (M0 lub M1), aby określić kliniczny stopień zaawansowania raka piersi cechowany od 0 do IV, przy czym stopień 0 charakteryzuje się najkorzystniejszym, natomiast stopień IV najmniej korzystnym rokowaniem [1].

Niezależnie od klasyfikacji anatomicznej, stopień zróżnicowania histologicznego komórek jest ważnym czynnikiem prognostycznym, a jego ocena powinna być zawsze uwzględniana przy określaniu stopnia zaawansowania raka piersi. Najczęściej wykorzystywany jest system klasyfikacji histologicznej Nottingham, który opiera się na ocenie trzech cech morfologicznych: stopnia tworzenia kanalików lub gruczołów, pleomorfizmu jądrowego i liczby mitotycznej. Podział według stopnia zróżnicowania komórek obejmuje trzy stopnie – od stopnia 1., w którym komórki są wysoko zróżnicowane, przez stopień 2. z pośrednim zróżnicowaniem komórek, do stopnia 3. – niskozróżnicowanych komórek nowotworowych, przy czym im wyższy stopień, tym prognozowane jest gorsze rokowanie dla chorych [1,11].

2.1.3. Podział molekularny raka piersi

Integracja oceny prognostycznej w diagnostyce raka piersi ma szczególne znaczenie, o czym świadczą ostatnie postępy w strategiach leczenia opartych na indywidualnym statusie receptora hormonalnego i wynikach paneli wielogenowych. W związku z tym standardem staje się obecnie badanie wzorców molekularnych zmian piersi, które są klasyfikowane w czterech głównych podtypach: Luminalny A, Luminalny B, HER2-dodatni i potrójnie ujemny rak piersi (TNBC) [12]. Segregacja do każdego podtypu opiera się na podstawie oceny poziomu ekspresji receptora estrogenowego (ER), receptora progesteronowego (PR), receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2) i czynnika proliferacji komórkowej (Ki-67) i jest określana za pomocą panelu immunohistochemicznego wycinka tkankowego z dodatkowym wykorzystaniem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* [13]. Ostatnio jednak coraz częściej do oceny podtypu molekularnego wykorzystuje się testy wielogenowe, takie jak Prosigna, Oncotype DX i MammaPrint [3,14].

2.1.4. Podtypy luminalny A oraz luminalny B raka piersi

Podtyp luminalny A jest najczęstszym podtypem molekularnym i wiąże się z najkorzystniejszym rokowaniem, przeważnie bezbolesnym przebiegiem klinicznym

i ogólnie mniejszym zajęciem węzłów chłonnych [15]. Guzy luminalne A charakteryzują się obecnością ER i/lub PR przy równoczesnym braku ekspresji HER2 i niskiej ekspresji markera proliferacji komórkowej Ki-67 (mniej niż 14% lub 20% - w zależności od źródła) [16–18]. Ze względu na dodatni status receptora hormonalnego, pacjentki z rakiem piersi o podtypie luminalnym A są podatne na terapię endokrynologiczną selektywnymi modulatorami receptora estrogenowego lub inhibitorem aromatazy [19,20].

Podtyp luminalny B stanowi około 20-30% przypadków inwazyjnego raka piersi [2]. Podtyp ten jest klasyfikowany jako HER2-ujemny lub HER2-dodatni, w zależności od poziomu ekspresji HER2. Większość raków piersi z mutacjami genu BRCA2 również należy do tej grupy [21,22]. Podtyp luminalny B jest uważany za najbardziej agresywną postać hormonozależnego raka piersi i oprócz hormonoterapii wymaga wprowadzenia dodatkowych cykli leczenia, takich jak chemioterapia lub terapia celowana anty-HER2 [20,23].

2.2. Chemokiny i ich receptory

Chemokiny CXC należą do rodziny cytokin chemotaktycznych obejmującej około 50 białek. Składają się z czterech reszt cysteinowych, które tworzą dwa mostki dwusiarczkowe, przy czym pierwsze dwie reszty cysteinowe oddzielone są pojedynczym aminokwasem. Ponadto chemokiny z grupy CXC są jednymi z kluczowych elementów regulujących procesy zapalne i angiogenne. W zależności od obecności 3-aminokwasowego motywu glutaminowo-leucyno-argininowego (ELR) na N-końcu łańcucha, chemokiny z grupy CXC dzieli się na dwie podgrupy, tj. ELR+ promujące angiogenezę oraz ELR- o właściwościach angiostatycznych. Wyjątkiem od zależności obecności motywu ELR od właściwości angiogennych jest chemokina CXCL12, który należy do podgrupy ELR-, ale zamiast tego jest zaangażowana w promowanie angiogenezę poprzez interakcję ze swoimi receptorami [24,25].

Chemokiny wyrażają swoje działanie głównie poprzez interakcje z klasycznymi receptorami chemokin (GPCR). GPCR są transbłonowymi receptorami związanymi z białkiem G, które po aktywacji przez ligand wywołują wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy. Wiązanie ligand-receptor odbywa się z zachowaniem stosunku 1:1, przy czym większość receptorów jest wieloligandowa w obrębie chemokin z danej grupy, a aktywacja danego receptora przez różne ligandy prowadzi może w efekcie do wywołania osobnych funkcji komórkowych [24,25].

2.2.1. Funkcje biologiczne chemokin

Chemokiny są zaangażowane w kontrolę wielu procesów, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych, odgrywając istotną rolę w migracji komórek i indukcji ich ruchu. Najważniejszą funkcją chemokin jest regulacja migracji leukocytów, która jest niezbędna do osiągnięcia równowagi immunologicznej w organizmie i wywołania odpowiedzi immunologicznej na infiltrację patogenów. Wraz ze swoimi receptorami, chemokiny oraz cząsteczki adhezyjne tworzą skomplikowaną sieć określającą między innymi kierunek migracji leukocytów oraz miejsce docelowe migracji. Oprócz roli regulatorów migracji komórek odpornościowych chemokiny biorą udział również w takich procesach jak migracja neuronów, angiogeneza, organogeneza czy wzrost embrionalny. W ostatnich latach badacze poświęcają coraz więcej uwagi roli chemokin w patogenezie wielu chorób o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym, takich jak łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów czy choroby alergiczne, jak również w schorzeniach rozrostowych, w tym w nowotworach piersi [24–26].

2.2.2. Rola chemokin w nowotworach

Chemokiny mogą być zaangażowane w proces nowotworzenia poprzez trzy mechanizmy:

- kontrolę angiogenezy, umożliwiającą wzrost guza i tworzenie przerzutów,
- regulację napływu leukocytów do mikrośrodowiska guza,
- bezpośredni wpływ na funkcjonowanie komórek nowotworowych.

Mechanizmy te mogą działać zarówno w sposób promujący rozrost guza, np. poprzez stymulację angiogenezy, tworzenie immunosupresyjnego mikrośrodowiska guza lub też zmianę profilu biologicznego samej komórki nowotworowej (zwiększona proliferacja, unikanie apoptozy i zmniejszona adhezja do podłoża), jak i w sposób hamujący – działając w sposób antyangiogeny, czy stymulując napływ leukocytów odpowiedzialnych za nieswoistą odporność przeciwnowotworową. Deregulacja ekspresji chemokin w mikrośrodowisku guza może również kierować komórki nowotworowe do innych lokalizacji, sprzyjając ich rozprzestrzenianiu się w organizmie [24–27].

2.2.3. Charakterystyka wybranych chemokin i ich receptorów w nowotworach piersi

2.2.3.1. CXCL1

Sugeruje się, że gen chemokiny CXCL1 jest ważnym czynnikiem biorącym udział w procesach nowotworowych piersi wśród młodych dorosłych [28]. Badanie ekspresji

tkankowej CXCL1 za pomocą barwienia immunohistochemicznego wykazało zwiększoną ekspresję tej chemokiny w stosunku do prawidłowej tkanki piersi [29]. Jednakże dane pochodzące od około 3000 pacjentów z bazy danych *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) wykazały nadekspresję mRNA CXCL1 tylko u 4-7% pacjentów z rakiem piersi. Pozostałe przypadki miały znacznie niższą ekspresję niż zdrowa tkanka, przy czym nadekspresja ta występowała częściej w TNBC [29,30], chociaż niektóre prace również donoszą o braku istotnych statystycznie różnic w ekspresji tej chemokiny pomiędzy tkanką zdrową a patologiczną [31]. Wyniki te potwierdzają badania nad ekspresją CXCL1 w poszczególnych liniach komórkowych raka piersi, gdzie otrzymano analogiczne wyniki, z wyjątkiem linii komórkowej BT-20 będącej typem potrójnie negatywnym [30].

CXCL1 może być zaangażowana w proces nowotworzenia w raku piersi w zależności od tego, czy dana linia komórkowa wykazuje ekspresję receptora dla CXCL1, tj. CXCR2 [30]. CXCL1 stymulować może proliferację komórek raka piersi, co wykazano w eksperymentach na potrójnie ujemnych i HER2-dodatnich liniach raka piersi [32]. Sugeruje się, że zwiększona ekspresja CXCL1 w rakach potrójnie ujemnych w sposób autokryny będzie przyczyniać się do zwiększonej ich proliferacji [32]. Dodatkowo CXCL1 może także wywierać działanie proprzeżyciowe i antyapoptotyczne na komórki raka piersi podczas terapii przeciwnowotworowej. Zaobserwowano, że zwiększenie ekspresji CXCL1 w odpowiedzi na radio- i/lub chemioterapię, może wpływać na ekspresję białek z rodziny Bcl-2, co w następstwie hamuje apoptozę komórek indukowaną terapią przeciwnowotworową oraz zwiększać będzie rekrutację do niszy nowotworowej mieloidalnych komórek supresorowych (MDSC), hamujących przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. Uważa się, że jest to jedna z przyczyn powstawania chemiooporności i radiooporności komórek raka piersi [30]. CXCL1 jest również ważna w funkcjonowaniu komórek macierzystych raka (CSC) w raku piersi, które głównie posiadają ekspresję CXCR2 [33,34]. Z tego powodu CXCR2 można uznać za jeden z markerów CSC raka piersi [34]. Jednoczesna ekspresja CXCL1 i CXCR2 skutkuje zwiększonym potencjałem proliferacyjnym i zdolnością samoodnowy CSC [30,34].

CXCL1 powoduje również migrację i przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT) komórek raka piersi, przy czym efekty te zostały wykazane dla poszczególnych linii komórkowych. Wpływ CXCL1 na migrację zaobserwowano dla linii komórkowych MDA-MB-231, MCF-7, ZR-75-1, HCC-1937 i SKBR3, lecz nie dla linii T47D, mimo

że komórki te wykazują ekspresję CXCR2. Indukcja EMT obserwowana była natomiast dla linii komórkowych MDA-MB-231, HCC-1937, SKBR3 i MCF-7 [30].

Migracja indukowana przez CXCL1 może dotyczyć również komórek niszy nowotworowej. Do mikrośrodowiska rekrutowane są neutrofile, komórki supresorowe pochodzenia granulocytarno-mieloidalnego, mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) oraz naiwne limfocyty T CD4+, które pod wpływem mikrośrodowiska guza przekształcają się w limfocyty T regulatorowe [30]. Dodatkowo CXCL1 należy do chemokin ELR+, stymulujących procesy angiogenezy [24]. Ponadto może także rekrutować hematopoetyczne komórki macierzyste/progenitorowe, które następnie różnicują się w MDSC. CXCL1 może być również ważna w tworzeniu przerzutów raka piersi w innych narządach, w tym do płuc, kości, mózgu i węzłów chłonnych [30], a jej krążący we krwi poziom jest dodatnio skorelowany z liczbą krążących komórek raka piersi [35].

Badania nad ekspresją CXCL1 w raku piersi sugerować mogą, że głównym źródłem tej chemokiny w mikrośrodowisku guza nie są *stricto* komórki nowotworowe, lecz pozostałe komórki składające się na niszę guza. Za główne źródło CXCL1 uznaje się przede wszystkim fibroblasty zmienione nowotworowo (CAFs), ale także makrofagi związane z nowotworem (TAMs) oraz komórki MSC pochodzące z tkanki tłuszczowej [30]. Fakt ten może stanowić podstawę w otrzymanywanych rozbieżnościach wyników badań przeprowadzanych na izolowanych liniach komórkowych oraz doniesień uzyskiwanych z badań bezpośrednio na tkankach raka piersi pochodzących od pacjentów, w tym badań nad poziomami ekspresji tej chemokiny.

Mało jest dostępnych wyników badań odnoszących się do krążącego poziomu CXCL1 u chorych na raka piersi. Ma i wsp. [36] odnotowali wyższe stężenie CXCL1 w surowicy u pacjentek z rakiem piersi niż u zdrowych kobiet. Wysokie poziomy CXCL1 w osoczu wraz z TGF- β u pacjentów z przerzutowym rakiem piersi były również związane ze zwiększonym wykrywaniem krążących komórek nowotworowych i krótszym całkowitym przeżyciem [35].

2.2.3.2. CXCL8

CXCL8 jest chemokina, która wykazuje działanie pronowotworowe w raku piersi. W zależności od źródła, mRNA CXCL8 w raku piersi ulega nadekspresji, obniżonej ekspresji lub nie wykazuje różnic w ekspresji względem zdrowej tkanki. Zwiększona ekspresja jest

najczęściej wykazywana przez ER-ujemne podtypy raka, zarówno HER2-dodatnie jak i potrójnie ujemne [29,37]. Dodatkowo poziom ekspresji CXCL8 jest zależny od stadium raka piersi i jest wyższy w tkankach przerzutowych i komórkach nowotworowych o stopniu zróżnicowania histologicznego 3 niż w komórkach nowotworowych o stopniu zróżnicowania 1 i 2 [29].

Chociaż szlaki osi CXCL8-CXCR1/2 zostały szeroko zbadane w przypadku proliferacji i apoptozy guza, dostępnych jest bardzo niewiele badań dotyczących jej funkcji w rozwoju i przerzutowaniu raka piersi. Główną rolą CXCL8 w rozwoju raka piersi wydaje się być jednak modyfikacja mikrośrodowiska guza, co przekłada się na jego progresję. Najnowsze dowody wskazują także, że chemokina ta może być kluczowym regulatorem aktywności CSC w raku piersi [22,37].

Komplementarna sygnalizacja w mikrośrodowisku guza pomiędzy CXCL8 wydzielaną przez komórki nowotworowe a CXCR1/2 ulegających ekspresji na otaczających komórkach stromalnych jest kluczowa dla progresji nowotworu i powstawania przerzutów oraz kontroli proliferacji CSC i ich samoodnawiania [37,38]. CXCL8 zwiększa także produkcję i wydzielanie różnych czynników przez komórki nowotworowe, w tym metaloproteinaz macierzy MMP-2 i MMP-9, które bezpośrednio odpowiadają za przebudowę macierzy międzykomórkowej, modulując w ten sposób tempo rozwoju oraz inwazyjność guza [22,38]. Stymulacja czynnikiem FGF ludzkich komórek raka piersi powodowała pośrednio zwiększenie produkcji ligandów CXCR2, głównie CXCL8 oraz CXCL1, co niezbędne było do wykazania indukowanej makrofagami migracji komórek rakowych. CXCL8 wydzielana przez komórki nowotworowe może nasilać progresję guza poprzez indukowanie EMT sąsiadujących nowotworowych komórek o fenotypie epithelialnym. Wydaje się, że CXCL8 jest jednym z czynników zaangażowanych w zmianę fenotypu komórkowego, co bezpośrednio warunkuje ich ruchliwość i inwazyjność oraz wydaje się mieć zasadniczą rolę w późniejszym utrzymywaniu cech mezenchymalnych przez komórki nowotworowe [39]. Pomędzy CXCL8 a EMT istnieje autokrynną pętlą sprzężenia zwrotnego. CXCL8 stymuluje proces EMT i inicjuje kaskadę cytokin i/lub czynników wzrostu, w tym samego CXCL8 [40].

Ponadto sygnalizacja osi CXCL8-CXCR1/2 odgrywa kluczową rolę w regulacji i ukierunkowaniu odpowiedzi immunologicznej, stanowiąc jeden z elementów ucieczki komórek nowotworowych przez układ immunologiczny. Opublikowane doniesienia zbiorczo sugerują, że CXCL8 może rekrutować makrofagi związane z guzem (TAMs), MDSC i neutrofile do mikrośrodowiska guza, co skutkuje tłumieniem przeciwnowotworowej

odpowiedzi immunologicznej cytotoksycznych komórek odpornościowych. Może to również osłabiać przeciwnowotworową aktywność komórek dendrytycznych i komórek NK [37,38].

CXCL8 współdziałając z VEGF jest jednym z głównych czynników stymulujących proces generowania neowaskularyzacji w guzie piersi [37]. CXCL8 stymuluje zarówno proliferację śródbłonna, jak i tworzenie kapilar *in vitro* w sposób zależny od stężenia. Oś CXCL8-CXCR2 dodatkowo nasila ten efekt poprzez stymulację ekspresji VEGF. Wśród raków piersi zarówno ER-pozytywnych, jak i ER-negatywnych poziom ekspresji CXCL8 pozytywnie koreluje z potencjałem przerzutowym komórek nowotworowych [37,38].

CXCR1 ulega szczególnej nadekspresji w subpopulacji CSC w porównaniu z bardziej zróżnicowanymi komórkami nowotworowymi, a ostatnie badania wskazują, że sygnalizacja poprzez zarówno receptor CXCR1, jak i CXCR2, stanowi ważny mechanizm obronny w regulacji aktywności CSC piersi, a sama oś CXCL8-CXCR1/2 może odgrywać kluczową rolę w progresji guza i przerzutach, poprzez kontrolowanie i napędzanie proliferacji i samoodnowy CSC oraz tworzenie nowych mammosfer w miejscach przerzutowych [37,41]. Zauważono także, że obecność fizjologicznych MSC pochodzenia szpikowego w pobliżu CSC raka piersi w obrębie niszy tworzącego się guza, wydaje się sprzyjać toczącemu się pierwszemu etapowi nowotworzenia za pośrednictwem cytokinowej sieci sygnalizacyjnej, między innymi poprzez IL-6, CXCL8 oraz pozostałe ligandy CXCR1 i CXCR2 [42].

W kilku pracach naukowych odnotowano zwiększone stężenie CXCL8 w surowicy lub w osoczu u pacjentek w każdym stadium zaawansowania raka piersi w porównaniu ze zdrowymi kobietami. Ponadto wykazano wyższe stężenia CXCL8 w podgrupach ER-dodatnich, PR-dodatnich i potrójnie ujemnych rakach piersi w stosunku do zdrowych osób. Kobiety z łagodnymi zmianami piersi również wykazywały wyższy poziom CXCL8 niż zdrowe osoby, ale tylko jedna praca wykazała istotne różnice między zmianami złośliwymi i łagodnymi [29]. Na podstawie wyników binarnej analizy regresji logistycznej stwierdzono, że stężenie CXCL8 w surowicy było predyktorem różnicowania między grupą zmian łagodnych, grupą raka piersi i grupą kontrolną zdrowych kobiet [43]. Zgodnie z tymi wynikami, CXCL8 może stanowić użyteczny marker diagnostyczny raka piersi.

2.2.3.3. CXCL12 i receptor CXCR4

Szlak sygnałowy CXCL12/CXCR4 pojawił się w ostatnich latach jako kluczowy czynnik w procesie nowotworzenia raka piersi. Kaskada CXCL12/CXCR4 jest zaangażowana w prawie każdy aspekt nowotworzenia raka piersi, w tym proliferację, ruchliwość komórek

i odległe przerzuty [44]. Jedynym ligandem receptora CXCR4 jest CXCL12, w przeciwieństwie do większości receptorów dla chemokin zapalnych. Ponadto, CXCR4 jest jedynym receptorem chemokinowym, którego pozbawienie ekspresji skutkuje śmiercią w okresie okołoporodowym myszy [24,45]. CXCL12 oprócz receptora CXCR4 łączy się także z atypowym receptorem ACKR3, a pozbawienie myszy jego ekspresji skutkuje nieprawidłowościami w procesie kardiogenezy [46]. Oś ta wydaje się więc posiadać ogromne znaczenie podczas rozwoju organizmu, a zaburzenia jej funkcjonowania mogą pojawiać się w przebiegu wielu chorób. Analiza ekspresji mRNA wykazała, że w porównaniu ze zdrowymi tkankami, poziom mRNA CXCL12 był istotnie niższy, podczas gdy mRNA CXCR4 był istotnie wyższy w tkankach BC [47–51]. Dalsza analiza poszczególnych podtypów molekularnych wykazała, że poziomy mRNA CXCL12 były istotnie niższe w podtypach TNBC i HER2-dodatnim raku piersi niż w podtypach luminalnych. Nie zaobserwowano jednak statystycznie istotnych różnic między podtypami TNBC i HER2-dodatnim [47,49,51]. Różnicę w ekspresji mRNA zaobserwowano także dla CXCR4 w różnych podtypach raka piersi. TNBC wykazywał wyższą ekspresję CXCR4 w porównaniu z podtypami luminalnymi i HER2-dodatnimi, podczas gdy nie było różnic w poziomach ekspresji między rakami piersi o podtypach HER2-dodatnim i luminalnym [47,50]. Ekspresja mRNA CXCL12 i CXCR4 nie korelowała ze sobą wśród pacjentek z rakiem piersi, ani jej poziom nie różnił się w poszczególnych stadiach zaawansowania [47,48], chociaż w kilku doniesieniach naukowych odnotowano związek między niższą ekspresją CXCL12 a słabo zróżnicowanymi komórkami nowotworowymi [51].

Mechanizmy molekularne, za pomocą których CXCR4 ułatwia wzrost pierwotnych guzów raka piersi, są szeroko badane i można je podsumować w następujący sposób:

- angiogeneza - fibroblasty obecne w pierwotnych rakach piersi są ważnym źródłem CXCL12. CXCL12 wytwarzany w mikrośrodowisku guza rekrutuje krążące komórki progenitorowe śródbłonna do miejsc pierwotnych guzów piersi i sprzyja powstawaniu mikronaczyń, zwiększając w ten sposób ich gęstość w tkance rakowej;
- typowe szlaki sygnałowe związane z proliferacją komórek - zidentyfikowano szereg dalszych efektorów CXCR4 (PI3K/AKT, Src/ERK1-2, NF- κ B i STAT3), które są dobrze znane ze swojej zdolności do stymulowania wzrostu, przyczyniając się do wzrostu pierwotnych guzów piersi. Wzajemne oddziaływanie między CXCR4 a innymi szlakami związanymi z komórkami macierzystymi, takimi jak Notch, Wnt i SHH, może być również zaangażowane w proliferację komórek raka piersi;

-
- rekrutacja komórek odpornościowych - oprócz progenitorów śródbłonka, rekrutowane są również komórki dendrytyczne. Komórki dendrytyczne hamują odporność przeciwnowotworową poprzez inaktywację cytotoksycznych limfocytów T, promując wzrost guza. Sekrecja CXCL12 zwiększa również ilość immunosupresyjnych Treg FOXP3+ i zmniejsza napływ komórek T CD8+ [26,44,52].

Przerzuty komórek nowotworowych do odległych lokalizacji wymagają kilku kolejnych etapów. Pierwszym etapem jest intrawaskularyzacja komórek nowotworowych z pierwotnych miejsc guza do naczyń krwionośnych, a następnie ich przeżycie w krążeniu, migracja do narządów wtórnych, z następującą adhezją i proliferacją komórek nowotworowych w docelowych narządach i tkankach. Oś CXCL12-CXCR4 jest jednym z najszerzej badanych szlaków sygnałowych chemokin CXC w przerzutach do miejsc odległych. CXCR4 promuje przerzuty raka piersi do narządów (kości, wątroby i płuc), w których jego ligand CXCL12 jest wytwarzany w dużych ilościach [52,53]. Do mikrośrodowiska guza pierwotnego, za pośrednictwem CXCL12 uwalnianego z komórek nowotworowych, rekrutowane są między innymi monocyty, które przekształcają się w TAMs, a następnie w wysepkowe makrofagi okołonaczyniowe. Transformacja ta jest jednokierunkowa i kontrolowana przez oś CXCL12/CXCR4. W konsekwencji TAMs łączą się z naczyniami krwionośnymi, zmniejszając integralność bariery śródbłonkowej, zwiększając przepuszczalność naczyń, co sprzyja powstawaniu przerzutów odległych raka piersi [26,44]. Ruchliwość i migracja komórek należą do niezbędnych zachowań komórek i przyczyniają się do powstawania przerzutów. W komórkach MDA-MB-231 raka piersi sygnalizacja CXCL12/CXCR4 wywołuje dwa efekty związane z migracją komórek, które są zależne od stężenia CXCL12 w komórkach TNBC. Niskie stężenia CXCL12 indukują pośrednio polimeryzację aktyny i lokomocję komórek, natomiast wyższe stężenia CXCL12 promują adhezję komórek [26,54]. Ostatnie badania wskazują na istotną rolę CXCL12 w indukcji EMT, zarówno w komórkach raka piersi TNBC, jak i w innych niż TNBC, a tym samym sprzyjając przerzutom [44,53].

W raku piersi odnotowano różne mechanizmy leżące u podstaw oporności na terapię indukowanej przez CXCL12/CXCR4. Sygnalizacja tej osi w raku piersi aktywuje szlaki sygnałowe PI3K i ERK, promując proliferację, chroniąc przed cytotoksycznością indukowaną chemioterapią i uszkodzeniami DNA. Co więcej, oś CXCL12/CXCR4 wspiera włóknienie mikrośrodowiska guza, zapobiegając tym osiągnięciu efektów terapeutycznych podczas stosowania blokerów immunologicznych punktów kontrolnych [44].

Mimo niższej niż w zdrowych tkankach ekspresji mRNA CXCL12, nieliczne prace skupiające się na krążącym poziomie CXCL12 u pacjentek z rakiem piersi wykazywały

wyższe stężenia tej chemokiny w porównaniu do zdrowych kobiet, jak i u kobiet ze zmianą łagodną piersi [55–57]. Żadna z tych prac jednak nie różnicowała pacjentek ze względu na podtyp molekularny raka, co może być główną przyczyną rozbieżności wyników, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, że w jednej z tych prac przy równoczesnej ocenie poziomu CXCR4 kierunek zmian krążącego receptora i poziomu jego ekspresji tkankowej był zgodny [55]. Nie mniej jednak oś CXCL12/CXCR4 ze względu na swój szeroki udział w procesie nowotworzenia wydaje się być ciekawym kandydatem na markera diagnostyczno-prognostycznego.

Rozdział 3.

Cel pracy

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym występującym u kobiet, dlatego też stanowi główne wyzwanie współczesnej onkologii. Obecnie diagnoza raka opiera się głównie na badaniach obrazowych, które następnie wymagają weryfikacji poprzez badanie materiału biopsyjnego. W praktyce klinicznej brak jest natomiast szybkich, małoinwazyjnych i łatwo dostępnych narzędzi diagnostycznych, które mogłyby posłużyć jako markery rozpoznawcze i prognostyczne u chorych na raka piersi. Markerów takich poszukuje się przede wszystkim w białkach lub peptydach zaangażowanych w proces nowotworzenia w sposób bezpośredni bądź pośredni. Dużym zainteresowaniem naukowym cieszy się mikrośrodowisko zmiany nowotworowej z jego komponentami jako czynnikami diagnostycznymi i prognostycznymi oraz potencjalnymi celami terapeutycznymi.

Jednym z potencjalnych kandydatów na markery nowotworowe jest grupa chemokin, które są ściśle związane z każdym etapem nowotworzenia. Zrąb guza piersi obfituje w fibroblasty, które są jednym z głównych źródeł chemokin. Inne źródła tych cząsteczek obejmują leukocyty, komórki nabłonkowe, śródbłonkowe i mezenchymalne, w tym komórki zmienione nowotworowo. Dlatego naturalnym wydaje się skupienie uwagi na tej grupie cząsteczek w poszukiwaniu nowych markerów pomocnych w procesie diagnostycznym raka piersi, podobnie do wielu innych naukowców, którzy również próbują ustalić ich użyteczność kliniczną.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest więc ocena stężenia wybranych chemokin (CXCL1, CXCL8, CXCL12) oraz wybranego receptora (CXCR4) jako potencjalnych wczesnych markerów nowotworowych w diagnostyce najczęściej występujących podtypów molekularnych raka piersi – typu luminalnego A oraz luminalnego B.

Cele szczegółowe rozprawy doktorskiej przedstawiono poniżej.

1. Oznaczenie osoczowych stężeń wybranych chemokin (CXCL1, CXCL8, CXCL12) i receptora (CXCR4) oraz markera porównawczego CA 15-3 u kobiet chorujących na raka piersi o podtypie luminalnym A lub luminalnym B oraz w grupie porównawczej kobiet ze zmianami łagodnymi piersi i w grupie kontrolnej zdrowych kobiet.
2. Ocena korelacji osoczowych stężeń badanych parametrów i CA 15-3 w całej grupie badanej, podgrupach raka, tj. luminalnym A lub luminalnym B, oraz w grupie porównawczej (tj. ze zmianami łagodnymi) i kontrolnej.

-
3. Ocena przydatności badanych parametrów w oparciu o czułość i swoistość diagnostyczną, dodatnią i ujemną wartość predykcyjną oraz moc diagnostyczną badań w oparciu o ocenę powierzchni pola pod krzywą ROC dla każdego parametru osobno oraz w łączonych kombinacjach z CA 15-3.
 4. Określenie przydatności badanych parametrów jako kandydatów na nowe markery nowotworowe raka piersi w podtypach luminalnym A lub luminalnym B.

Rozdział 4.

Realizacja celów naukowych

Prace nad publikacjami oraz oznaczenia do badań do rozprawy doktorskiej wykonane zostały w Zakładzie Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych przy współpracy z Białostockim Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie.

Środki finansowania pochodziły z subwencji naukowych, realizowanych na terenie Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o numerach: SUB/1/DN/21/006/1201, SUB/1/DN/22/006/1021, B.SUB.23.150.

Badania zostały przeprowadzone zgodnie z zasadami określonymi w Deklaracji Helsińskiej. Protokół badań został zatwierdzony przez lokalną Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – numer R-I-002/51/2015 oraz APK.002.104.2021 (kopie załączone w rozdziale 11).

Zastosowana metodyka badań, opis grup badanych, otrzymane wyniki i najważniejsze wnioski przedstawione zostaną za pomocą omówienia poszczególnych prac wchodzących w cykl publikacyjny rozprawy doktorskiej.

4.1. Omówienie publikacji 1. Motyka J., Kicman A., Kulesza M., Ławicki S. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients. *Cancers*, 2023, 15(12), 3118.

Celem pracy była analiza przeglądowa dostępnej literatury pod kątem przydatności grupy chemokin CXC ELR-dodatnich w diagnostyce raka piersi oraz podsumowanie zebranych wyników.

Na wstępie została krótko omówiona epidemiologia raka piersi oraz obecnie obowiązujące wytyczne procesu diagnostycznego z uwzględnieniem roli krążących markerów. Opisano również możliwe ograniczenia używanych metod diagnostycznych, wskazując jednocześnie na trendy w badaniach naukowych mające na celu poprawę i udoskonalenie diagnostyki, z uwzględnieniem chemokin jako grupy związków o dużym potencjale diagnostyczno-prognostycznym.

W kolejnym rozdziale dokonano krótkiego przeglądu na temat raka piersi. Została tutaj podkreślona złożoność tej choroby pod względem histologicznym oraz molekularnym. Zawarta została także rycina podsumowująca dotychczasową wiedzę na temat czynników protekcyjnych, czynników ryzyka oraz czynników o nieznanym wpływie na proces

nowotworzenia w obrębie piersi oraz akapit opisujący klasyczne krążące markery raka piersi, tj. CA 15-3, CEA i CA 27.29.

Kolejna część pracy przedstawia podstawową wiedzę na temat chemokin z podgrupy CXC – ich ogólnej budowy oraz podziału ze względu na obecność motywu ELR w łańcuchu białkowym oraz fizjologicznych funkcji. Krótko opisano również rolę tej grupy chemokin w procesach nowotworzenia.

Następnie dokonano przeglądu dostępnej literatury na temat poziomu ekspresji, poziomu krążących we krwi ELR-dodatnich chemokin oraz ich korelacji z wskaźnikami kliniczno-patologicznymi w raku piersi. Zebrane doniesienia zostały podzielone na podrozdziały przypisane poszczególnym chemokinom (4.1. CXCL1, 4.2. CXCL2 i CXCL3, 4.3. CXCL5, 4.4. CXCL6 i CXCL7, 4.5 CXCL8). Omawiany w głównej części pracy potencjał diagnostyczno-prognostyczny zestawiono następnie w tabeli zbiorczej z uwzględnieniem źródła pochodzenia każdej cząsteczki, która znalazła się na końcu artykułu.

Podsumowując, obecnie diagnostyka raka piersi nie dysponuje łatwo dostępnymi narzędziami diagnostycznymi i prognostycznymi, zwłaszcza we wczesnych stadiach choroby. W tym artykule podsumowano istniejącą wiedzę na temat roli chemokin CXCL ELR-dodatnich CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 i CXCL8 jako markerów oznaczonych we krwi obwodowej i w tkankach, w diagnostyce i rokowaniu kobiet chorych na raka piersi. Ustalenie jednoznacznego znaczenia chemokin CXCL ELR-pozytywnych w raku piersi wymaga jednak dalszych badań. Uważa się jednak, że kilka związków z tej grupy zasługuje na szczególną uwagę. Na podstawie analizy zgromadzonych danych stwierdzono, iż CXCL8 wstępnie wykazuje wysoki potencjał jako nowy marker diagnostyczny i prognostyczny, podczas gdy CXCL2 i CXCL6 można w przyszłości uznać za markery prognostyczne. W przypadku CXCL1 i CXCL5 nie można było jednak określić jednoznacznie ich przydatności ze względu na niewystarczającą ilość doniesień.

Powyższa analiza doniesień naukowych stanowiła podstawę do rozpoczęcia badań obejmujących zagadnienia obecnej rozprawy doktorskiej. Zagadnienia dotyczące roli w nowotworzeniu, poziomu tkankowej ekspresji oraz przydatności diagnostycznej osi chemokinowej CXCL12/CXCR4 w raku piersi stanowiące podstawę merytoryczną do wykonania oznaczeń tych cząsteczek w rozprawie doktorskiej zostały opisane w pracy oryginalnej znajdującej się w podrozdziale 4.3 (omówienie pracy) oraz rozdziale 10. (praca oryginalna) jako część składowa wstępu, wyników oraz dyskusji pracy.

4.2. Omówienie publikacji 2. Motyka J., Gacuta E., Kicman A., Kulesza M., Ławicki P., Ławicki S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(22), 6694.

W niniejszej publikacji zbadano stężenia CXCL1 i CXCL8 w osoczu pacjentek z rakiem piersi w roli potencjalnych markerów nowotworowych jako parametrów indywidualnych lub w połączeniu z rutynowo stosowanym markerem CA 15-3. Ponadto oceniono także stężenia tych chemokin wśród pacjentek z łagodnymi zmianami piersi, jak również zmiany stężeń badanych parametrów w osoczu przed i po leczeniu chirurgicznym.

Do badania włączono grupę 100 pacjentek z rakiem przewodowym piersi o podtypie luminalnym A lub luminalnym B, poddanych diagnostyce i leczeniu chirurgicznemu w Białostockim Centrum Onkologii. Znaczna większość pacjentek (96% grupy badanej) znajdowała się we wczesnym stopniu (I-IIa) zaawansowania raka piersi. Grupa kontrolna składała się z 50 pacjentek z łagodną zmianą piersi (gruczolakowłókniak) i 50 zdrowych kobiet. Materiał do badań stanowiła krew żylna pobrana od pacjentek na antykoagulant, tj. heparynę litową. Oznaczenia stężeń CXCL1 i CXCL8 wykonano metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Stężenia CA 15-3 oznaczono przy pomocy metody chemiluminescencyjnej z użyciem mikrocząsteczek (CMIA). Analiza wyników oparta została o testy nieparametryczne oraz krzywą ROC.

Wykazano znamienne wyższe stężenie CXCL8 oraz CA 15-3 u pacjentek z rakiem piersi w porównaniu ze zdrową kontrolą oraz kobietami ze zmianą łagodną. W zależności od podtypu luminalnego, CA 15-3 wykazywał istotnie wyższe stężenia zarówno dla podtypu luminalnego A, jak i luminalnego B w porównaniu ze zdrowymi kobietami, natomiast CXCL8 – wyłącznie dla podtypu luminalnego B. Zarówno CXCL8 jak i CA 15-3 wykazały wyższe stężenia wyłącznie w podtypie B w porównaniu z grupą kobiet ze zmianą łagodną piersi. Istotne dodatnie korelacje wykazywano jedynie między CXCL1 i CXCL8 w całej grupie badanej, jak również dla obu podtypów luminalnych oraz w grupie kobiet ze zmianą łagodną piersi. Pooperacyjne stężenia CXCL1 i CXCL8 w całej grupie badanej nie zmieniły się istotnie po leczeniu chirurgicznym. Wzrost ich stężeń w podgrupie kobiet z rakiem luminalnym A był najprawdopodobniej odpowiedzią na proces gojenia się rany chirurgicznej.

Aby ocenić użyteczność kliniczną badanych parametrów jako potencjalnych markerów, dla każdego parametru obliczona została czułość i swoistość diagnostyczna, dodatnia i ujemna wartość predykcyjna oraz moc diagnostyczna testu wyznaczona przy pomocy pola pod krzywą ROC (AUC). W całej grupie badanej, jak również w poszczególnych podgrupach

luminalnych raka piersi, najwyższą wartością czułości, dodatniej i ujemnej wartości predykcijnej oraz mocą diagnostyczną wykazał się CXCL8, przewyższając tym samym wyniki markera porównawczego CA 15-3. Jednakże w podgrupie pacjentek z podtypem luminalnym A, żaden z badanych parametrów, jak również i CA 15-3, nie osiągnął statystycznie wyższej mocy diagnostycznej testu względem wartości granicznej AUC=0.5. Dopiero wprowadzenie dwuparametrycznego testu łączonego CXCL1+CA15-3 oraz trójparametrycznego (CXCL1-CXCL8+CA15-3) pozwalało na osiągnięcie istotnych statystycznie wyższych wartości AUC względem AUC=0.5. Warto także zauważyć, że kombinacje te znacząco podwyższyły przydatność diagnostyczną testu, poprzez wzrost AUC.

W świetle uzyskanych wyników CXCL8 wydaje się być testem o największej przydatności wśród ocenianych parametrów w procesie diagnostycznym raka piersi jako pojedynczy marker, natomiast CXCL1 wydaje się mieć znaczenie diagnostyczne w połączeniu z CA 15-3 w teście dwuparametrycznym, jak i trójparametrycznym z CXCL8. Wstępne informacje sugerują także, iż status menopauzalny pacjentek nie miał większego wpływu na uzyskane wyniki.

4.3. Omówienie publikacji 3. Motyka J., Gacuta E., Kicman A., Kulesza M., Malinowski P., Ławicki S. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer. Cancer Management and Research, 2023, 15, 573-589.

Oś sygnałowa CXCL12/CXCR4 jest najczęściej badanym CXC-chemokinowym szlakiem sygnałowym w patogenezie raka piersi. Jedynym ligandem receptora CXCR4 jest CXCL12, dlatego też jednoczesna ocena obu tych cząsteczek wydaje się logicznym następstwem wynikającym ze specyfiki ich interakcji. Dlatego też celem niniejszej publikacji było określenie przydatności diagnostycznej CXCL12 i receptora CXCR4 jako nowych markerów nowotworowych u pacjentek z podtypem luminalnym A lub luminalnym B raka piersi we wczesnym stadium zaawansowania, a także porównanie wyników z rutynowo stosowanym markerem CA 15-3.

Do badania włączono 100 pacjentek z wczesnym rakiem piersi podtypu luminalnego A lub luminalnego B, 50 kobiet z łagodnymi zmianami w piersi oraz 50 zdrowych kobiet. Materiał do badań stanowiła krew żylna pobrana od pacjentek na antykoagulant – heparynę litową. Stężenia CXCL12 i CXCR4 oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA), marker porównawczy CA 15-3 - metodą elektrochemiluminescencji (ECLIA). Analiza wyników

oparta została o testy nieparametryczne oraz krzywą ROC. Dodatkowo wykorzystano analizę ekspresji mRNA CXCL12 oraz CXCR4 w oparciu o bazę genomową *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) z użyciem narzędzia ULUCAN.

Badanie wstępne na podstawie danych pochodzących z TCGA na temat ekspresji mRNA wykazało, że w porównaniu ze zdrowymi tkankami, poziom mRNA CXCL12 był istotnie niższy, podczas gdy mRNA CXCR4 był istotnie wyższy w tkankach raka piersi. Dalsza analiza poszczególnych podtypów molekularnych wykazała, że poziomy mRNA CXCL12 były istotnie niższe w podtypach TNBC i HER2 niż w podtypach luminalnych. Nie zaobserwowano jednak statystycznie istotnych różnic między podtypami TNBC i HER2. Zauważono również wyższą ekspresję mRNA CXCR4 w TNBC w porównaniu z podtypami luminalnymi i HER2, przy jednoczesnym braku różnic w poziomach ekspresji między podtypami HER2 i luminalnymi. Ekspresja mRNA CXCL12 i CXCR4 nie korelowała między sobą u pacjentek z rakiem piersi, ani jej poziom nie różnił się w poszczególnych stadiach choroby. Na podstawie ww. wyników z bazy genomowej TCGA podjęto decyzję o oznaczeniu krążących stężeń CXCL12 i CXCR4 w osoczu pacjentek chorujących na raka piersi.

Badając stężenie CXCL12 wykazano, iż w całej grupie badanej chorych na raka piersi było ono znamienne niższe w porównaniu z grupą zdrowych kobiet, natomiast stężenia CXCR4 i markera porównawczego CA 15-3 wykazały znacząco wyższe poziomy. Wyłącznie stężenia CXCR4 wśród pacjentek z rakiem piersi były znacząco wyższe w porównaniu do grupy kobiet z łagodnymi zmianami, natomiast stężenia CXCL12 były znacząco niższe w grupie kobiet ze zmianami łagodnymi w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych kobiet. Patrząc na poszczególne podgrupy luminalne, w porównaniu z grupą zdrowych kobiet CXCR4 i CA 15-3 wykazywały istotnie wyższe stężenia w podgrupie chorych z rakiem luminalnym A i luminalnym B, podczas gdy CXCL12 – istotnie niższe stężenia. Wyniki te mogą wskazywać na rolę CXCL12 i CXCR4 jako odpowiednio ujemnego i dodatniego markera raka piersi. W podgrupie pacjentów z podtypem luminalnym B otrzymano znacząco niższe stężenia CXCL12 w odniesieniu do grupy kobiet z łagodnymi zmianami piersi. Badając korelacje pomiędzy osoczym poziomem CXCL12, CXCR4 i CA 15-3, zaobserwowano znamienne dodatnią korelację jedynie pomiędzy CXCL12 i CXCR4 w grupie kobiet z łagodnymi zmianami w piersi oraz słabą ujemną korelację pomiędzy CXCL12 i CXCR4 w grupie kontrolnej zdrowych kobiet.

Największą przydatność diagnostyczną (czułość i swoistość diagnostyczna, dodatnia i ujemna wartość predykcyjna, trafność diagnostyczna) oraz moc diagnostyczną testu zarówno

w całej grupie badanej, jak i w poszczególnych podtypach molekularnych, wykazywał CXCL12, tym samym znacznie przewyższając wartości wykazane dla markera porównawczego CA 15-3. CXCR4 osiągał natomiast porównywalne wartości wyżej wymienionych wskaźników względem CA 15-3. W przypadku analizy wieloparametrowej (CXCL12+CA 15-3, CXCR4+CA 15-3, CXCL12+CXCR4+CA 15-3) zaobserwowano wzrost czułości, ujemnej wartości predykcyjnej i mocy diagnostycznej testu, osiągając najwyższe wskaźniki dla testu trójparametrycznego zarówno w całej grupie badanej, jak i w obu podtypach luminalnych raka piersi.

Na podstawie prezentowanych wyników wykazano przydatność diagnostyczną CXCL12 i CXCR4 zwłaszcza w połączeniu z rutynowym markerem CA 15-3 jako test trójparametryczny, który może być w przyszłości rozważany jako marker diagnostyczny wczesnego raka piersi, szczególnie dla podtypów luminalnego A i luminalnego B.

Rozdział 5.

Wnioski

1. Wykazano istotnie wyższe osoczowe stężenia CXCL8 i CXCR4 (markery dodatnie) oraz istotnie niższe stężenie CXCL12 (marker ujemny) w grupie kobiet we wczesnym stadium raka piersi, zarówno w podtypach luminalnym A i luminalnym B, w porównaniu z grupą zdrowych kobiet, co może świadczyć o ich znaczeniu w patogenezie tego nowotworu.
2. Wykazano znamienne wyższe stężenia CXCL8 i CXCR4 w całej grupie pacjentek we wczesnym stadium raka piersi oraz w podtypie luminalnym B w odniesieniu do grupy porównawczej kobiet ze zmianami łagodnymi piersi, co może być przydatne w diagnostyce różnicowej.
3. Najwyższą przydatnością diagnostyczną badań, ocenianą za pomocą czułości i swoistości diagnostycznej, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej oraz mocy diagnostycznej badań, cechowały się oznaczenia chemokiny CXCL12.
4. Łączna analiza badanych parametrów zwiększała czułość diagnostyczną, ujemną wartość predykcyjną oraz moc diagnostyczną testu, a najwyższe wartości uzyskano w przypadku testu trójparametrycznego CXCL12+CXCR4+CA15-3.
5. Na podstawie uzyskanych wyników sugeruje się użyteczność diagnostyczną chemokin CXCL8, CXCL12 oraz receptora CXCR4 jako potencjalnych biomarkerów nowotworowych wczesnego raka piersi o podtypach luminalnym A lub luminalnym B, a zwłaszcza w łącznej analizie trójparametrycznej CXCL12+CXCR4+CA15-3, jako nowy panel diagnostyczny.

Rozdział 6. Bibliografia

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board *Breast Tumours: Who Classification of Tumours*; WHO Classification Editorial Board, Ed.; 5th ed.; World Health Organization: Lyon, **2019**; Vol. 2; ISBN 9283245008.
2. 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, doi:10.1016/J.GENDIS.2018.05.001.
3. Gomes Do Nascimento, R.; Otoni, K.M. Histological and Molecular Classification of Breast Cancer: What Do We Know? *Mastology* **2020**, *30*, 20200024, doi:10.29289/25945394202020200024.
4. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/CAAC.21660.
5. Giaquinto, A.N.; Sung, H.; Miller, K.D.; Kramer, J.L.; Newman, L.A.; Minihan, A.; Jemal, A.; Siegel, R.L. Breast Cancer Statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 524–541, doi:10.3322/CAAC.21754.
6. SEER*Explorer: An Interactive Website for SEER Cancer Statistics. Surveillance Research Program, National Cancer Institute.
7. Trieu, P.D.; Mello-Thoms, C.R.; Barron, M.L.; Lewis, S.J. Look How Far We Have Come: BREAST Cancer Detection Education on the International Stage. *Front. Oncol.* **2023**, *12*, doi:10.3389/FONC.2022.1023714.
8. Tadesse, G.F.; Tegaw, E.M.; Abdisa, E.K. Diagnostic Performance of Mammography and Ultrasound in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Ultrasound* **2023**, *26*, 355–367, doi:10.1007/S40477-022-00755-3.
9. Giuliano, A.E.; Connolly, J.L.; Edge, S.B.; Mittendorf, E.A.; Rugo, H.S.; Solin, L.J.; Weaver, D.L.; Winchester, D.J.; Hortobagyi, G.N. Breast Cancer-Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA. Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 290–303, doi:10.3322/CAAC.21393.
10. Kalli, S.; Semine, A.; Cohen, S.; Naber, S.P.; Makim, S.S.; Bahl, M. American Joint

-
- Committee on Cancer's Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: What the Radiologist Needs to Know. *Radiographics* **2018**, *38*, 1921–1933, doi:10.1148/RG.2018180056.
11. Yan, R.; Ren, F.; Li, J.; Rao, X.; Lv, Z.; Zheng, C.; Zhang, F. Nuclei-Guided Network for Breast Cancer Grading in HE-Stained Pathological Images. *Sensors (Basel)*. **2022**, *22*, doi:10.3390/S22114061.
 12. Harbeck, N.; Penault-Llorca, F.; Cortes, J.; Gnant, M.; Houssami, N.; Poortmans, P.; Ruddy, K.; Tsang, J.; Cardoso, F. Breast Cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*, doi:10.1038/S41572-019-0111-2.
 13. Tsang, J.Y.S.; Tse, G.M. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv. Anat. Pathol.* **2020**, *27*, 27–35, doi:10.1097/PAP.0000000000000232.
 14. Beňačka, R.; Szabóová, D.; Guľašová, Z.; Hertelyová, Z.; Radoňák, J. Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. **2022**, *14*, doi:10.3390/CANCERS14215444.
 15. Hashmi, A.A.; Aijaz, S.; Khan, S.M.; Mahboob, R.; Irfan, M.; Zafar, N.I.; Nisar, M.; Siddiqui, M.; Edhi, M.M.; Faridi, N.; et al. Prognostic Parameters of Luminal A and Luminal B Intrinsic Breast Cancer Subtypes of Pakistani Patients. *World J. Surg. Oncol.* **2018**, *16*, doi:10.1186/S12957-017-1299-9.
 16. Cheang, M.C.U.; Chia, S.K.; Voduc, D.; Gao, D.; Leung, S.; Snider, J.; Watson, M.; Davies, S.; Bernard, P.S.; Parker, J.S.; et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients with Luminal B Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2009**, *101*, 736–750, doi:10.1093/JNCI/DJP082.
 17. Orrantia-Borunda, E.; Anchondo-Nuñez, P.; Acuña-Aguilar, L.E.; Gómez-Valles, F.O.; Ramírez-Valdespino, C.A. Subtypes of Breast Cancer. *Breast Cancer* **2022**, 31–42, doi:10.36255/EXON-PUBLICATIONS-BREAST-CANCER-SUBTYPES.
 18. Arrechea Irigoyen, M.A.; Vicente García, F.; Córdoba Iturriagagoitia, A.; Ibáñez Beroiz, B.; Santamaría Martínez, M.; Guillén Grima, F. [Molecular Subtypes of Breast Cancer: Prognostic Implications and Clinical and Immunohistochemical Characteristics]. *An. Sist. Sanit. Navar.* **2011**, *34*, 219–233, doi:10.4321/S1137-66272011000200008.
 19. Rocca, A.; Farolfi, A.; Maltoni, R.; Carretta, E.; Melegari, E.; Ferrario, C.; Cecconetto, L.; Sarti, S.; Schirone, A.; Fedeli, A.; et al. Efficacy of Endocrine Therapy in Relation to Progesterone Receptor and Ki67 Expression in Advanced Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, *152*, 57–65, doi:10.1007/S10549-015-3423-2.
-

-
20. Horvath, E. Molecular Subtypes of Breast Cancer-What Breast Imaging Radiologists Need to Know. *Rev Chil Radiol* **2021**, *27*, 17–26.
 21. Guzmán-Arocho, Y.D.; Rosenberg, S.M.; Garber, J.E.; Vardeh, H.; Poorvu, P.D.; Ruddy, K.J.; Kirkner, G.; Snow, C.; Tamimi, R.M.; Peppercorn, J.; et al. Clinicopathological Features and BRCA1 and BRCA2 Mutation Status in a Prospective Cohort of Young Women with Breast Cancer. *Br. J. Cancer* **2022**, *126*, 302–309, doi:10.1038/S41416-021-01597-2.
 22. Ha, H.; Debnath, B.; Neamati, N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics* **2017**, *7*, 1543–1588, doi:10.7150/thno.15625.
 23. 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, doi:10.1016/J.SOC.2017.08.005.
 24. Zlotnik, A.; Burkhardt, A.M.; Homey, B. Homeostatic Chemokine Receptors and Organ-Specific Metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 597–606, doi:10.1038/NRI3049.
 25. Legler, D.F.; Thelen, M. Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function. *Chimia (Aarau)*. **2016**, *70*, 856, doi:10.2533/chimia.2016.856.
 26. Masih, M.; Agarwal, S.; Kaur, R.; Gautam, P.K. Role of Chemokines in Breast Cancer. *Cytokine* **2022**, *155*, 155909, doi:10.1016/j.cyto.2022.155909.
 27. Raza, S.; Rajak, S.; Tewari, A.; Gupta, P.; Chattopadhyay, N.; Sinha, R.A.; Chakravarti, B. Multifaceted Role of Chemokines in Solid Tumors: From Biology to Therapy. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *86*, 1105–1121, doi:10.1016/J.SEMCANCER.2021.12.011.
 28. Yi, S.; Zhou, W. Tumorigenesis-Related Key Genes in Adolescents and Young Adults with HR(+)/HER2(-) Breast Cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2020**, *13*, 2701.
 29. Motyka, J.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Ławicki, S. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. **2023**, *15*, 3118, doi:10.3390/cancers15123118.
 30. Korbecki, J.; Bosiacki, M.; Barczak, K.; Łagocka, R.; Brodowska, A.; Chlubek, D.; Baranowska-Bosiacka, I. Involvement in Tumorigenesis and Clinical Significance of CXCL1 in Reproductive Cancers: Breast Cancer, Cervical Cancer, Endometrial Cancer, Ovarian Cancer and Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7262, doi:10.3390/ijms24087262.
 31. Abrahamsson, A.; Rzepecka, A.; Dabrosin, C. Equal Pro-Inflammatory Profiles of
-

-
- CCLs, CXCLs, and Matrix Metalloproteinases in the Extracellular Microenvironment In Vivo in Human Dense Breast Tissue and Breast Cancer. *Front. Immunol.* **2018**, *8*, doi:10.3389/fimmu.2017.01994.
32. Bhat, K.; Sarkissyan, M.; Wu, Y.; Vadgama, J. V. GRO α Overexpression Drives Cell Migration and Invasion in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 21–30, doi:10.3892/or.2017.5668.
33. Ciummo, S.L.; D'Antonio, L.; Sorrentino, C.; Fieni, C.; Lanuti, P.; Stassi, G.; Todaro, M.; Di Carlo, E. The C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 Sustains Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Promotes Tumor Progression and Immune Escape Programs. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.689286.
34. Wang, Y.; Tu, L.; Du, C.; Xie, X.; Liu, Y.; Wang, J.; Li, Z.; Jiang, M.; Cao, D.; Yan, X.; et al. CXCR2 Is a Novel Cancer Stem-like Cell Marker for Triple-Negative Breast Cancer. *Onco. Targets. Ther.* **2018**, *Volume 11*, 5559–5567, doi:10.2147/OTT.S174329.
35. Divella, R.; Daniele, A.; Abbate, I.; Bellizzi, A.; Savino, E.; Simone, G.; Giannone, G.; Giuliani, F.; Fazio, V.; Gadaleta-Caldarola, G.; et al. The Presence of Clustered Circulating Tumor Cells (CTCs) and Circulating Cytokines Define an Aggressive Phenotype in Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Causes Control* **2014**, *25*, 1531–1541, doi:10.1007/s10552-014-0457-4.
36. Ma, K.; Yang, L.; Shen, R.; Kong, B.; Chen, W.; Liang, J.; Tang, G.; Zhang, B. Th17 Cells Regulate the Production of CXCL1 in Breast Cancer. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *56*, 320–329, doi:10.1016/j.intimp.2018.01.026.
37. Mishra, A.; Suman, K.H.; Nair, N.; Majeed, J.; Tripathi, V. An Updated Review on the Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in the Progression and Metastasis of Breast Cancer. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 6551–6561, doi:10.1007/S11033-021-06648-8.
38. Liu, Q.; Li, A.; Tian, Y.; Wu, J.D.; Liu, Y.; Li, T.; Chen, Y.; Han, X.; Wu, K. The CXCL8-CXCR1/2 Pathways in Cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2016**, *31*, 61–71, doi:10.1016/j.cytogfr.2016.08.002.
39. Fernando, R.I.; Castillo, M.D.; Litzinger, M.; Hamilton, D.H.; Palena, C. IL-8 Signaling Plays a Critical Role in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Carcinoma Cells. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 5296–5306, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0156.
40. David, J.M.; Dominguez, C.; Hamilton, D.H.; Palena, C. The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines* **2016**, *4*,
-

doi:10.3390/VACCINES4030022.

41. Molczyk, C.; Singh, R.K. CXCR1: A Cancer Stem Cell Marker and Therapeutic Target in Solid Tumors. *Biomedicines* **2023**, *11*, doi:10.3390/BIOMEDICINES11020576.
42. Liu, S.; Ginestier, C.; Ou, S.J.; Clouthier, S.G.; Patel, S.H.; Monville, F.; Korkaya, H.; Heath, A.; Dutcher, J.; Kleer, C.G.; et al. Breast Cancer Stem Cells Are Regulated by Mesenchymal Stem Cells through Cytokine Networks. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 614–624, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0538.
43. Wang, J.; He, Q.; Shao, Y.G.; Ji, M. Chemokines Fluctuate in the Progression of Primary Breast Cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2013**, *17*, 596–608.
44. Zielińska, K.A.; Katanaev, V.L. The Signaling Duo CXCL12 and CXCR4: Chemokine Fuel for Breast Cancer Tumorigenesis. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 3071, doi:10.3390/cancers12103071.
45. Ödemis, V.; Lamp, E.; Pezeshki, G.; Moepps, B.; Schilling, K.; Gierschik, P.; Littman, D.R.; Engele, J. Mice Deficient in the Chemokine Receptor CXCR4 Exhibit Impaired Limb Innervation and Myogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* **2005**, *30*, 494–505, doi:10.1016/j.mcn.2005.07.019.
46. Gerrits, H.; Van Ingen Schenau, D.S.; Bakker, N.E.C.; Van Disseldorp, A.J.M.; Strik, A.; Hermens, L.S.; Koenen, T.B.; Krajnc-Franken, M.A.M.; Gossen, J.A. Early Postnatal Lethality and Cardiovascular Defects in CXCR7-Deficient Mice. *Genesis* **2008**, *46*, 235–245, doi:10.1002/DVG.20387.
47. Motyka, J.; Gacuta, E.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Malinowski, P.; Ławicki, S. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer. *Cancer Manag. Res.* **2023**, *Volume 15*, 573–589, doi:10.2147/CMAR.S416382.
48. Liu, H.; Li, Z.; Deng, M.; Liu, Q.; Zhang, T.; Guo, W.; Li, P.; Qiao, W. Prognostic and Clinicopathological Value of CXCL12/SDF1 Expression in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Clin. Chim. Acta.* **2018**, *484*, 72–80, doi:10.1016/J.CCA.2018.05.041.
49. Mehraj, U.; Alshehri, B.; Khan, A.A.; Bhat, A.A.; Bagga, P.; Wani, N.A.; Mir, M.A. Expression Pattern and Prognostic Significance of Chemokines in Breast Cancer: An Integrated Bioinformatics Analysis. *Clin. Breast Cancer* **2022**, *22*, 567–578, doi:10.1016/J.CLBC.2022.04.008.
50. Guo, K.; Feng, G.; Yan, Q.; Sun, L.; Zhang, K.; Shen, F.; Shen, M.; Ruan, S. CXCR4 and CXCR3 Are Two Distinct Prognostic Biomarkers in Breast Cancer: Database Mining for CXCR Family Members. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20*, 4791–4802,

doi:10.3892/MMR.2019.10784.

51. Hozhabri, H.; Moghaddam, M.M.; Moghaddam, M.M.; Mohammadian, A. A Comprehensive Bioinformatics Analysis to Identify Potential Prognostic Biomarkers among CC and CXC Chemokines in Breast Cancer. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, doi:10.1038/S41598-022-14610-2.
52. Yao, Q.; Xu, C.; Zhao, H.; Chen, H. CXCR4 in Breast Cancer: Oncogenic Role and Therapeutic Targeting. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *4953*, doi:10.2147/DDDT.S84932.
53. Yang, Y.; Li, J.; Lei, W.; Wang, H.; Ni, Y.; Liu, Y.; Yan, H.; Tian, Y.; Wang, Z.; Yang, Z.; et al. CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Cancer: From Mechanisms to Clinical Applications. *Int. J. Biol. Sci.* **2023**, *19*, 3341–3359, doi:10.7150/IJBS.82317.
54. Pasquier, J.; Abu-Kaoud, N.; Abdesselem, H.; Madani, A.; Hoarau-Véchet, J.; Thawadi, H. Al; Vidal, F.; Couderc, B.; Favre, G.; Rafii, A. SDF-1alpha Concentration Dependent Modulation of RhoA and Rac1 Modifies Breast Cancer and Stromal Cells Interaction. *BMC Cancer* **2015**, *15*, doi:10.1186/S12885-015-1556-7.
55. Dąbrowska, E.; Przyłipiak, A.; Zajkowska, M.; Piskor, B.M.; Sidorkiewicz, I.; Szmitkowski, M.; Lawicki, S. Possible Diagnostic Application of CXCL12 and CXCR4 as Tumor Markers in Breast Cancer Patients. *Anticancer Res.* **2020**, *40*, 3221–3229, doi:10.21873/anticancer.14303.
56. Lu, X.; Wang, Z.; Yuan, H. Changes and Significance of Plasma CXCL12 Levels in Patients with Breast Cancer. *China Res. Prev. Treat.* **2005**, *32*, 562–564, doi:10.3971/J.ISSN.1000-8578.527.
57. Aljurany, A.N.H.; Samarrai, O.R. Al Evaluation of Chemokine CXCL12 Level with Oxidative Stress in Breast Cancer. *Int. J. Health Sci. (Qassim).* **2022**, *6382–6392*, doi:10.53730/ijhs.v6nS3.7414.

Rozdział 7.

Streszczenie

7.1. Streszczenie w języku polskim

Rak piersi jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych w populacji kobiet i jednocześnie charakteryzuje się dużą heterogennością, co przekłada się na zwiększone trudności w diagnostyce tej choroby. W praktyce klinicznej brakuje szybkich i nieinwazyjnych metod, które mogłyby przyspieszyć proces diagnostyczny i umożliwić wykrycie nieprzerzutuującego pierwotnego raka piersi, co następnie bezpośrednio będzie przekładało się na wcześniejsze rozpoczęcie leczenia i poprawę przeżywalności pacjentek. Oznaczanie markerów nowotworowych z krwi obwodowej jest postulowane jako szybka i minimalnie inwazyjna metoda diagnostyki raka piersi, mająca znaczenie zarówno prognostyczne, jak i diagnostyczne. Jako potencjalne markery rozpatruje się obecnie wiele bioaktywnych związków, do których można zaliczyć chemokiny.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie przydatności diagnostycznej wybranych chemokin (CXCL1, CXCL8, CXCL12) oraz receptora (CXCR4) jako potencjalnych wczesnych markerów nowotworowych w najczęściej występujących typach molekularnych raka piersi – typie luminalnym A oraz luminalnym B.

Do badań zakwalifikowano 100 pacjentek z rakiem piersi we wczesnym stadium zaawansowania o podtypie luminalnym A lub luminalnym B, 50 kobiet ze zmianami łagodnymi oraz 50 zdrowych kobiet. Materiał do badań stanowiło osocze ubogopłytkowe. Stężenia CXCL1, CXCL8, CXCL12 oraz CXCR4 oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA), marker porównawczy CA 15-3 – metodą chemiluminescencji z użyciem mikrocząsteczek (CMIA) lub metodą elektrochemiluminescencji (ECLIA). Przydatność diagnostyczna badanych parametrów została określona przy pomocy czułości i swoistości diagnostycznej, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej, natomiast określenie mocy diagnostycznej testu wykonano przy pomocy funkcji ROC-AUC.

W badaniach wykazano istotnie wyższe osoczowe stężenie CXCL8, CXCR4 i CA 15-3 oraz istotnie niższe osoczowe stężenie CXCL12 (ujemny marker) w grupie kobiet z wczesnym rakiem piersi, zarówno w podtypie luminalnym A i luminalnym B, w porównaniu ze zdrowymi kobietami, co może świadczyć o ich znaczeniu w procesie nowotworzenia piersi. Znamienne wyższe stężenia CXCL8 i CXCR4 w całej

grupie pacjentek z wczesnym rakiem piersi oraz w podtypie luminalnym B raka piersi w odniesieniu do grupy porównawczej kobiet ze zmianami łagodnymi piersi mogą stanowić podstawę do stworzenia narzędzia do diagnostyki różnicowej raka piersi.

Najwyższą przydatnością diagnostyczną badań, ocenianą za pomocą czułości i swoistości diagnostycznej, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej oraz mocy diagnostycznej badań, cechowały się oznaczenia chemokiny CXCL12 przewyższając tym samym wartości uzyskane dla markera porównawczego CA 15-3. Łączna analiza badanych parametrów zwiększała czułość diagnostyczną, ujemną wartość predykcyjną oraz moc diagnostyczną testu, a najwyższe wartości uzyskano w przypadku kombinacji CXCL12+CXCR4+CA15-3.

Na podstawie uzyskanych wyników sugeruje się użyteczność diagnostyczną chemokin CXCL8, CXCL12 oraz receptora CXCR4 jako potencjalnych biomarkerów nowotworowych wczesnego raka piersi o podtypach luminalnym A lub luminalnym B, a zwłaszcza w łącznej analizie trójparametrycznej CXCL12+CXCR4+CA15-3, jako nowy panel diagnostyczny.

7.2. Streszczenie w języku angielskim

Breast cancer is one of the most common malignancies in the female population while being characterized by high heterogeneity, which translates into increased difficulty in the diagnosis of this disease. Clinical practice, however, lacks fast and non-invasive methods that can speed the diagnostic process and allow the detection of non-metastatic primary breast cancer, which will then translate directly into earlier treatment initiation and improvement of patient survival. Determination of tumor markers from peripheral blood is postulated as a quick and minimally invasive method for the diagnosis of cancer, with both prognostic and diagnostic significance. As potential markers, a number of bioactive compounds are currently being considered among which chemokines can be included.

The objective of this doctoral dissertation was to determine selected chemokines (CXCL1, CXCL8, CXCL12) and receptor (CXCR4) as potential early tumor markers in the most common molecular subtypes of breast cancer - luminal A and luminal B breast cancer.

A total of 100 patients with early-stage luminal subtype A and luminal subtype B breast cancer, 50 women with benign lesions and 50 healthy women were classified for the studies. Materials for the study include platelet-poor plasma. The concentrations of CXCL1, CXCL8, CXCL12 and CXCR4 were determined by immunoenzymatic assay (ELISA), the comparative marker CA 15-3 - by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) or electrochemiluminescence method (ECLIA). The diagnostic reliability of the studied parameters was determined by diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, positive predictive value, negative predictive value, while diagnostic power of the test by ROC-AUC function.

The studies showed significantly higher plasma concentrations of CXCL8, CXCR4 and CA 15-3 and significantly lower plasma CXCL12 concentration (negative marker) in a group of women with early breast cancer, in both luminal A and luminal B subtypes, compared to healthy women, which may indicate their importance in the process of breast tumorigenesis.

Significantly higher concentrations of CXCL8 and CXCR4 in the entire group of patients with early breast cancer and in luminal subtype B breast cancer in relation to the comparison group of women with benign breast lesions may be the basis for creating a diagnostic tool for differential evaluation of breast cancer.

The highest diagnostic utility of the tests, estimated by diagnostic sensitivity and specificity, positive and negative predictive value, and diagnostic power of the tests, was

characterized by CXCL12, thus surpassing the values obtained for the comparative marker CA 15-3. The combined analysis of the tested parameters increased the sensitivity, negative predictive value and diagnostic power of the test, and the highest values were obtained for the CXCL12+CXCR4+CA15-3 combination.

Based on the results, the diagnostic utility of chemokines CXCL8, CXCL12 and the CXCR4 receptor as potential tumor biomarkers of early breast cancer with luminal A or luminal B subtypes is suggested, especially in the combined three-parametric analysis of CXCL12+CXCR4+CA15-3 as a new diagnostic panel.

Rozdział 8.
**Publikacja 1. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and
Prognostic Markers for Breast Cancer Patients**

Autorzy: Motyka Joanna, Kicman Aleksandra, Kulesza Monika, Ławicki Sławomir

Czasopismo: Cancers (Basel), 2023, 15(12), s. 3118.

Numer DOI:10.3390/cancers15123118

IF: 5.200; **MNiSW:** 200 punktów

Dyscypliny naukowe czasopisma: inżynieria biomedyczna, biologia medyczna, nauki farmaceutyczne, nauki medyczne, nauki o zdrowiu, biotechnologia, nauki biologiczne, nauki chemiczne, weterynaria

Review

CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients

Joanna Motyka ¹, Aleksandra Kicman ², Monika Kulesza ¹ and Sławomir Ławicki ^{1,*}

¹ Department of Population Medicine and Lifestyle Diseases Prevention, Medical University of Białystok, 15-269 Białystok, Poland; joanna.motyka@sd.umb.edu.pl (J.M.)

² Department of Aesthetic Medicine, Medical University of Białystok, 15-267 Białystok, Poland

* Correspondence: slawicki@umb.edu.pl

Simple Summary: Currently, breast cancer diagnostics do not have readily available diagnostic and prognostic tools, especially in the early stages of the disease. Therefore, there is a constant need to search for tumor markers that can improve current diagnostics. One such molecule that may be a potential marker could be among a group of chemokines. In this work, we summarize reports that evaluate the expression and peripheral blood concentration of ELR-positive CXC chemokines as potential markers and prognostic factors for breast cancer.

Abstract: As the most common type of malignant lesion, breast cancer is a leading challenge for clinicians. Currently, diagnosis is based on self-examination and imaging studies that require confirmation by tissue biopsy. However, there are no easily accessible diagnostic tools that can serve as diagnostic and prognostic markers for breast cancer patients. One of the possible candidates for such markers is a group of chemokines that are closely implicated in each stage of tumorigenesis. Many researchers have noted the potential of this molecule group to become tumor markers and have tried to establish their clinical utility. In this work, we summarize the results obtained by scientists on the usefulness of the ELR-positive CXC group of chemokines in ancillary diagnosis of breast cancer.

Keywords: breast cancer; prognosis; diagnosis; ELR-positive; CXC chemokines; expression; concentration; plasma; serum



Citation: Motyka, J.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Ławicki, S. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients. *Cancers* **2023**, *15*, 3118. <https://doi.org/10.3390/cancers15123118>

Academic Editor:
Hans-Christian Kolberg

Received: 17 March 2023

Revised: 1 June 2023

Accepted: 5 June 2023

Published: 8 June 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 remains the most prevalent cancer in the world. According to WHO data from the GLOBOCAN database, the global incidence in 2020 reached more than 2.2 million new cases, with mortality estimated at around 685,000 [1]. Breast cancer mortality, estimated by the 5-year survival period of patients varies depending on the disease stage at the time of diagnosis. For stage IV breast cancer, survival rates are below 30%, whereas for stage I cases, they are over 99% [2]. These numbers illustrate the importance of early diagnosis in treating breast cancer.

Current diagnostic methods are primarily based on imaging methods such as ultrasound, X-ray, and magnetic resonance imaging (MRI). Implementing mammography screening in many countries for groups of women with an increased risk of breast cancer, that is, around the age of 50, was a breakthrough in streamlining the diagnostic process. Many studies have shown a significant decrease in the risk of breast cancer mortality after introducing mammography into medical practice [3,4]. However, imaging methods also have limitations. A major one is the sheer size of the lesion found in the breast. In the case of microscopic tumors, it is difficult to determine the potential nature of the lesion. Consequently, imaging results must be correlated with a patient's clinical examination and relied on for the histopathologic evaluation of the lesion obtained by tissue biopsy [5]. In current medicine, biopsy evaluation is the only method of confirming a cancerous lesion, which is unfortunately invasive.

Circulating cancer biomarkers have received significant attention in recent years. Venous blood is an easily accessible material, and the collection method has been a routine procedure widely used in disease diagnoses. The most frequently determined blood compounds in diagnosing breast cancer are carcinoma antigen 15-3 (CA 15-3), carcinoembryonic antigen (CEA), or carcinoma antigen 27.29 (CA 27.29). However, it should be noted that these molecules have limited sensitivity and specificity, which results in their unsuitability for screening [6]. Due to the limited utility of current markers in the ancillary diagnosis of breast cancer, there is a search for new compounds whose assays could be an adjunctive tool in the diagnosis of this condition. Such compounds could be chemokines [7]. Chemokines in the body form and maintain the immune response, engage in the process of angiogenesis, and determine the chemoattraction and migration of cells that possess chemokine receptors. As a result, these compounds may be involved in each phase of the tumorigenesis process, from the tumor's initiation and proliferation by local dissemination up to its spread in distant locations. There have also been reports of chemokines' role in driving resistance to applied treatments [7,8]. For these reasons, chemokines may be helpful in the diagnostic process and act as potential candidates for tumor markers. Apart from circulating molecules' blood concentrations, many researchers also note that their elevated or reduced tissue expression may have prognostic significance for the course of treatment. They may also correlate with lymph node involvement, the occurrence of distant metastasis, or at least be associated with a specific molecular subtype of breast cancer. This yet-to-be-studied area brings great, but still rather dim, hopes for advancing the diagnostic and prognostic evaluation of breast cancer. In this paper, we introduce and describe the potential use of the ELR-positive CXC group of chemokines in ancillary diagnosis of breast cancer.

2. Breast Cancer: A Brief Overview

Breast cancer is a heterogeneous disease. It has high histopathological and molecular diversity, as well as various degrees of cell differentiation. Breast cancer often manifests itself as a palpable lesion in the breast. Other less common symptoms include tightening or pulling of the skin over the lesion, retraction or leakage of the nipple, or, less commonly, a change in breast size, skin color, or enlargement of the axillary lymph nodes (including lymph node engagement with the simultaneous absence of symptoms originating from the breast itself). Such symptoms can simultaneously occur with benign breast lesions; therefore, imaging and histological examinations based on fine- or core-needle biopsy are necessary for identification [9].

Based on the histological type, breast lesions are divided into benign tumors, lesions of an indeterminate, borderline, or uncertain nature, carcinoma in situ, or G3 intraepithelial neoplasia, and malignant tumors with distant metastatic foci [10,11] (Supplementary Table S1). Malignant breast cancers are classified into two major groups: carcinomas and sarcomas. Carcinomas are the most common breast tumors and originate from the epithelial cells of the breasts' lobules or ducts [11]. Breast cancer can be classified molecularly or by staging systems. Particularly relevant is the molecular classification that divides breast cancer into four major subtypes: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched (HER2+), and triple-negative breast cancer (TNBC) [12,13]. Segregation into each subtype is based on the expressions of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and cell proliferation factor (Ki-67) [14].

The pathogenesis of breast cancer is a complex process that remains incompletely studied. Although much is known about risk factors and protective factors, some aspects are still controversial. A diagram containing various factors is shown in Figure 1.

The biochemical diagnosis of breast cancer has mostly supportive applications and generally uses cancer antigen 15-3 (CA 15-3), cancer-embryonic antigen (CEA), and cancer antigen 27.29 (CA 27.29) [15–18]. However, the previously mentioned low sensitivity and specificity of these compounds preclude their use in screening [19,20]. In addition, these markers have low concentrations at the early stages of breast cancer, which decreases their screening utility. Importantly, serum concentrations of CA 15-3, CEA, and CA 27.29

are affected by several pathological phenomena that coexist with cancerous lesions in the breast. These include, among others, liver, lung, and endocrine diseases [21–24]. However, the aforementioned compounds have been found to have clinical utility in monitoring the effectiveness of therapy and detecting early recurrence or the presence of metastases, especially in cases where radiological diagnoses cannot be used [6].

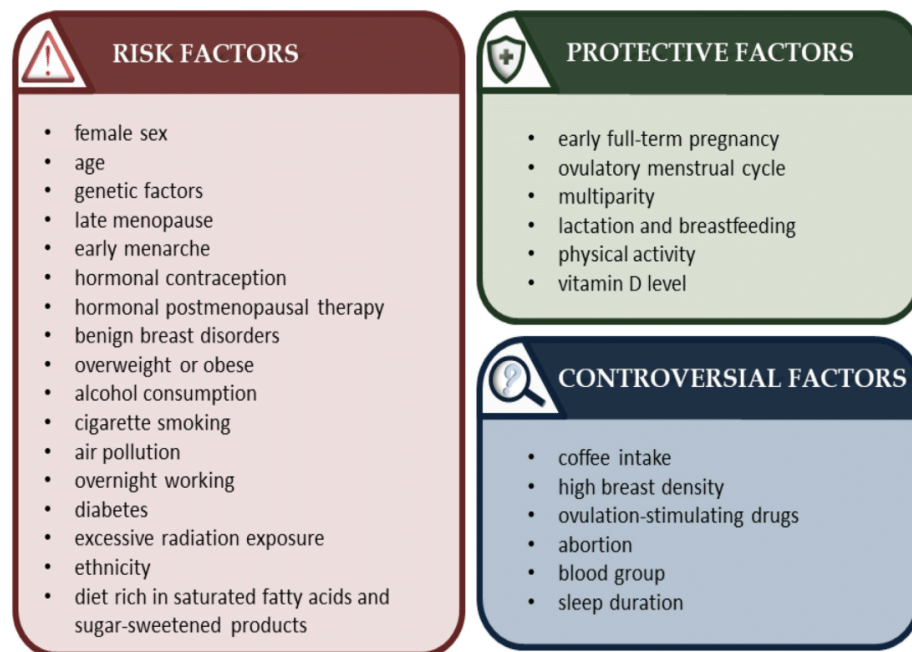


Figure 1. Breast cancer risk and protective factors [9,11,25–27].

3. An Outline of the CXC Chemokine Group

CXC chemokines belong to a family of chemotactic cytokines comprising around 50 proteins. They consist of four cysteine residues forming two disulfide bridges. The first two cysteine residues are separated by a single amino acid. As previously mentioned, chemokines are involved in controlling many processes, both physiological and pathological. One of their most important functions is regulating immune balance and directing the immune response [28,29]. In addition, CXC group chemokines are among the key elements regulating inflammatory and angiogenic processes. Depending on whether a 3-amino-acid glutamine–leucine–arginine motif (ELR motif) is present at the N-terminus of the chain, the CXC group of chemokines is divided into two subgroups: ELR+ promoting angiogenesis and ELR- with angiostatic properties. It is important to note that CXCL12, which belongs to the ELR- subgroup, is an exception to ELR motif dependence for angiostatic properties, and is instead involved in promoting angiogenesis through its interaction with receptors.

Three mechanisms may involve chemokines in tumorigenesis:

1. Control of angiogenesis—Allows tumor growth and metastasis by providing easy access to oxygen and nutrients.
2. Immune regulation—Controls the influx of leukocytes into the tumor microenvironment.
3. Modification of the functioning of cancer cells—Interacts with chemokine receptors and triggers intracellular signaling pathways.

These mechanisms can act in a procarcinogenic manner, e.g., by stimulating angiogenesis, the influx of lesion-promoting leukocytes, or altering the biological profile of the cell (increased proliferation, avoidance of apoptosis, and decreased adhesion to the microenvironment). However, they can also act in an anticarcinogenic manner by inhibiting angiogenesis and stimulating non-specific anti-tumor immunity through an influx of leuko-

cytes [8,28–31]. Dysregulation of chemokine expression in the tumor microenvironment can also direct tumor cells to other locations and promote their spread in the body.

The tumor microenvironment and its components, including growth factors [32–34], chemokines [33,35–37], or matrix metalloproteinases [38–40], are of scientific interest for their potential diagnostic and prognostic factors and as potential therapeutic targets. The breast tumor stroma, however, is abundant in fibroblasts, which are one of the main sources of chemokines. Other sources of these molecules include leukocytes, epithelial, endothelial, and mesenchymal cells, including tumor-altered cells [7,28,41,42]. Therefore, focusing on this group of molecules in the breast cancer diagnostic process seems natural.

4. CXC ELR-Positive Chemokines as Biomarkers of Breast Cancer

The issues discussed in the current chapter are summarized in Table 1 at the end of the article.

4.1. CXCL1

Examination of CXCL1 tissue expression by immunohistochemical (IHC) staining showed an increased expression of this chemokine relative to normal breast tissue [43,44]. On the contrary, data from about 3000 patients from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database showed overexpression of CXCL1 mRNA in only 4–7% of breast cancer (BC) patients. The other cases had significantly lower expression than healthy tissue, with this overexpression appearing more frequently in TNBC [45–50]. Furthermore, Bild et al. and Narita et al. noted that higher CXCL1 expression was found in TNBC tissues ($p = 0.0005$ [51], $p < 0.05$ [52]). Pawitan et al. showed that an increase in CXCL1 expression was significantly associated with the presence of mutations in the BRCA1 gene ($p = 0.0035$), which is commonly associated with TNBC subtypes [53]. Additionally, higher CXCL1 mRNA expression was noted in ER-negative breast cancer types relative to ER-positive samples ($p < 0.0001$) in data from the OncoPrint and TCGA databases [54–56]. Yang et al. also showed significantly higher CXCL1 expression in ER-negative breast cancer lines BT-549 and MDA-MB-468 than in ER-positive lines (MCF-7, T47D, ZR-75-1) [56]. High-tissue CXCL1 expression correlated positively with tumor size ($p = 0.04$ [36]), TNM staging ($p < 0.001$ [45]; $p = 0.002$ [57]), positive lymph nodes ($p = 0.001$) [45], degree of lymph node infiltration ($p = 0.016$) [45], the occurrence of distant metastases ($p = 0.015$ [36], $p < 0.05$ [57]), shorter overall survival ($p < 0.001$ [45]; $p = 0.0186$ [55]), and shorter relapse-free survival ($p = 0.0442$ [55]; $p = 0.017$ [57]; $p = 0.01$ [47]). However, Zou et al.'s study showed different results. They studied the correlation between CXCL1 expression and prognostic factors and found no correlation between ER, PR, HER2, or Ki 67 receptor status, tumor size, and lymph node involvement. However, they noted a correlation between high CXCL1 expression and higher tumor grade, metastases, and shorter relapse-free survival [43]. Hozhabri et al. also confirmed increased CXCL1 mRNA expression with tumor grade growth, with grade 3 reaching the highest level and grade 1 ($p < 0.0001$ [50]) for the lowest level. Interestingly, in Li et al.'s study, CXCL1 expression was not associated with overall survival for the entire study group [47–50]. By contrast, its higher expression correlated with longer relapse-free survival ($p < 0.001$) in the luminal-only breast cancer group [48].

Part of the findings were also related to data obtained from blood tests. Ma et al. [36] noted higher CXCL1 serum levels among breast cancer patients than healthy women ($p = 0.011$). In our own study, we did not compare the CXCL1 plasma concentrations between luminal breast cancer patients and healthy women [35]. Moreover, in women with benign breast lesions, plasma CXCL1 concentrations also remained at similar levels to cancer patients and healthy women [35]. High plasma levels of CXCL1 along with TGF- β in patients with metastatic breast cancer were also associated with increased detection of circulating tumor cells (TGF- β $p < 0.0001$; CXCL1 $p = 0.02$) and shorter overall survival (CXCL1 $p = 0.05$; CXCL1+ TGF- β $p = 0.001$) [33].

4.2. CXCL2 and CXCL3

CXCL2, similar to CXCL1, showed increased mRNA expression in only about 7% of primary tumors, whereas, in secondary tumors, the expression reached almost 20% [44,57]. However, the TCGA and Oncomine dataset showed that CXCL2 expression, alongside CXCR3 expression, is significantly lower in healthy tissues than in breast cancer ($p < 0.001$ [47–49,58]; $p < 0.0001$ [50]). CXCL2 and CXCL3 expression follow a similar pattern to CXCL1, and their overexpression in TNBC compared to ER-positive lines can be observed [47,48,52,57,58]. An et al. also examined the expression's effect on prognostic factors based on available databases. According to two databases, GSE3494-GPL96 and GSE1456-GPL96, high CXCL2 expression was associated with longer relapse-free survival ($p = 0.002$; $p = 0.003$, respectively). According to the GSE3143 dataset, CXCL2 expression was inversely correlated with length of time to overall survival ($p = 0.017$) [58]. The survival analysis results based on the Kaplan–Meier plotter database, however, opposed those obtained by the GSE3143 dataset, where, ultimately, higher CXCL2 expression correlated with longer overall survival ($p < 0.001$ [58]; $p = 0.021$ [48,49]) and longer relapse-free survival ($p = 0.00034$ [50]; $p < 0.001$ [47]). Additionally, higher CXCL2 expression correlated inversely with metastasis ($p = 0.002$), resulting in a better prognosis [47].

Despite the similarities between CXCL2 and CXCL3 expression patterns, higher CXCL3 expression appears to be an unfavorable prognostic factor. Increased CXCL3 expression was found in aggressive and metastatic cancer cells [57,59] and was associated with higher tumor grades ($p < 0.001$) [50], shorter overall survival ($p = 0.042$) [48,49], and shorter relapse-free survival ($p = 0.038$) [57]. However, studies by Chen et al. and Hozhabri et al. showed an inverse relationship for CXCL3, where its higher expression was associated with longer relapse-free survival ($p = 0.015$ [47]; $p = 0.016$ [50]) and did not affect overall survival [47,50].

4.3. CXCL5

Studies using data from the Oncomine database showed significantly lower CXCL5 mRNA expression in breast cancer tissue than in healthy breast tissue ($p < 0.05$) [47–49]. However, based on data from the TCGA and Genotype-Tissue Expression databases, expression levels were not significantly different [48,49]. Overexpression of CXCL5 in TNBC compared to ER+ subtypes was also noted in molecular subtype analyses of breast cancer [48–50,55,57]. Higher expression was also shown in metastatic cells and grade 3 tumor cells than in grade 1 primal tumor cells ($p < 0.05$ [57]; $p < 0.0001$ [50]). CXCL5 expression showed no correlation with overall survival [47–50]. Depending on the sources, higher CXCL5 expression did not correlate [48,49,57] or positively correlate ($p = 0.008$ [47]; $p = 0.04$ [50]) with longer relapse-free survival. Li et al. [60] had contradictory findings based on the Gene Expression Omnibus database (GSE12276, GSE2603, GSE2034, and GSE5327) and determined that low CXCL5 expression was associated with better outcomes for metastasis-free survival ($p = 0.021$). Additionally, by examining the protein's tissue expression by IHC staining, CXCL5 protein expression was significantly higher in breast cancer tissues than in tissues of healthy controls ($p < 0.05$) [60].

Li et al. [60] obtained similar results when serum concentrations were determined. Higher concentrations were obtained in breast cancer patients than in the serum of healthy controls ($p < 0.001$) [60]. Li et al. also determined the potential of serum CXCL5 concentrations as a diagnostic marker by obtaining a diagnostic sensitivity of 65.3%, a diagnostic specificity of 60%, and a diagnostic test power of AUC = 0.6970 [60]. Wang et al. also studied the serum concentration of CXCL5 and found that it did not differ between breast cancer patients and patients with benign and proliferative breast lesions. However, the concentration differed by tumor size ($p < 0.001$) and positively correlated with Ki-67 expression levels ($p = 0.027$) [37].

4.4. CXCL6 and CXCL7

Bièche et al.'s study of CXCL6 mRNA expression in breast cancer, as well as data analyses from the TCGA, Oncomine, and Genotype-Tissue Expression databases, showed no differences between tumor and physiological breast tissues [48,49,57]. However, expression was higher in the TNBC molecular subtype than in ER+ subtypes ($p < 0.05$) [48]. However, Chen et al. and Hozhabri et al. showed significantly lower CXCL6 expression in breast cancer than in normal tissues ($p < 0.05$) [47,50]. They noted that the CXCL6 expression level was significantly higher in metastatic cancer cells and grade 3 tumor cells than in low graded cells but showed no correlation with overall survival ($p < 0.05$ [57]; $p < 0.001$ [50]). Chen et al. and Hozhabri et al. also noticed this lack of correlation but managed to show a positive correlation between CXCL6 expression and relapse-free survival ($p < 0.001$ [47]; $p = 0.00012$ [50]). On the other hand, other studies revealed that CXCL6 overexpression was associated with longer overall survival ($p = 0.036$) [48,49].

CXCL7 mRNA expression levels, depending on the database, showed lower levels in cancerous tissue than in physiological breast tissue ($p < 0.05$) (Oncomine and UALCAN databases) or no difference between levels in these tissues (TCGA and GTEX databases) [47–50]. However, CXCL7 expression was unaffected by receptor status [47,48]. CXCL7 expression correlated with longer relapse-free survival ($p = 0.014$ [47]; $p = 0.018$ [50]) but not with overall survival [47–50]. Wang et al. obtained inverse correlations, where stage III had higher expression than stage I ($p < 0.05$) or stage II ($p < 0.001$) breast cancer tissue and correlated with worse overall survival ($p = 0.0017$) [61].

Wang et al. [37] found that CXCL7 serum levels were negatively correlated with Ki 67 expression levels ($p = 0.042$). However, serum levels did not differ between malignant, benign, and proliferative breast lesions [37]. Kosir and Ju [62] also examined CXCL7 serum levels and noted that they were significantly higher in breast cancer patients than in healthy individuals ($p < 0.05$). Based on 23 pairs of serous specimens, they also assessed that, relative to preoperative levels, postoperative CXCL7 levels decreased significantly ($p < 0.05$) and reached levels comparable to healthy controls [62].

4.5. CXCL8

Depending on the source, CXCL8 mRNA in breast cancer is overexpressed ($p < 0.05$) [47,52], underexpressed ($p < 0.001$ [50]), or not differentially expressed [48,49] in healthy tissue. Higher expression has been found in ER-negative types ($p = 0.019$ [52]; $p < 0.002$ [55]; $p < 0.05$ [63]), TNBC ($p < 0.0001$ [47]; $p < 0.01$ [48,49]) and HER2+ ($p = 0.0009$ [47]; $p < 0.05$ [48,49]; $p < 0.0001$ [50]) than in ER+ types of breast cancer. CXCL8 expression has varied by breast cancer stage ($p = 0.00561$) [48,49] and is higher in metastatic tissues and grade 3 tumor cells than in grade 1 and 2 tumor cells ($p < 0.05$ [57]; $p < 0.0001$ [50]).

Higher CXCL8 expression correlated with shorter overall survival ($p = 0.022$ [63]; $p = 0.0003$ [47]; $p < 0.0001$ [48–50]), shorter relapse-free survival ($p < 0.0001$ [47–50]; $p = 0.009$ [57]), and metastatic recurrence ($p < 0.0001$ [57]). The worst prognosis was shown for ER-type breast cancer with high CXCL8 expression and significantly shorter overall survival ($p < 0.001$ [63]) and relapse-free survival ($p = 0.036$ [48,49]). Low CXCL8 mRNA expression indicated a higher chance of 10-year survival with sensitivity, specificity, and test power equal to 63.16%, 65.12%, and AUC = 0.6328, respectively. The tissue expression of CXCL8 protein was higher in breast cancer than in healthy tissues ($p < 0.05$ [48,49]). It was also higher in ER- status tissues than in ER+ tissues ($p = 0.006$ [64]). Higher CXCL8 protein expression directly correlated with shorter relapse-free survival ($p < 0.001$ [64]) and negatively correlated with ER expression ($p = 0.02$ [64]). Kamalakar et al. did not determine a correlation between ER status and CXCL8 tissue expression [65], but this may be due to their small sample size. However, no correlation was shown between CXCL8 tissue expression and age, menopausal status, tumor size, or tumor grade [64].

Several scientific papers have also reported increased serum CXCL8 ($p = 0.047$ [66]; $p < 0.001$ [67]; $p < 0.001$ [68]) or plasma levels ($p < 0.001$ [52]; $p = 0.005$ [35]) in patients with early ($p = 0.002$) and advanced stages ($p = 0.001$) of breast cancer [69] compared with

healthy women. Additionally, higher concentrations relative to healthy controls were shown for the ER+ ($p = 0.021$), PR+ ($p = 0.039$), and TNBC ($p = 0.046$) subgroups of breast cancer [68]. Women with benign breast lesions also showed higher levels of CXCL8 than healthy women ($p < 0.001$ [52]; $p = 0.033$ [35]; $p < 0.001$ [68]), but only one paper showed significant differences between malignant and benign lesions ($p < 0.001$ [68]). Wang et al. also noted significant differences between benign lesions and in situ versus invasive cancer ($p = 0.006$), but no post hoc evaluation was performed to define the differences between the groups [37]. However, they did evaluate the differences between the in situ group and the invasive type, obtaining higher concentrations for the in situ type ($p = 0.002$). Based on the results of binary logistic regression analysis, they found that serum CXCL8 concentration was a predictor of differentiation between the benign lesion group ($p = 0.024$), breast cancer group ($p = 0.011$), and healthy controls [37]. According to these results, CXCL8 may be a useful diagnostic marker for breast cancer, which we also investigated in a different paper CXCL8 concentration showed higher sensitivity (70%), positive predictive value (77.78%), negative predictive value (50%), diagnostic test power (AUC = 0.6410), and similar specificity (60%) than CA 15-3 (55%; 75.34%; 41.56%; AUC = 0.6300; 64%, respectively) [35]. A panel of CXCL8 and CA 15-3 combined increased the sensitivity of the test to 88%, the negative predictive value to 61.29%, and the diagnostic power of the test to AUC = 0.6582 with a high positive predictive value (73.95%) and a decrease in specificity (38%) [35]. Khalaf et al. also evaluated the diagnostic potential of CXCL8 levels. CXCL8 concentration differentiated a group of breast cancer patients from healthy controls with 95.6% sensitivity, 95% specificity, and a diagnostic test power equal to AUC = 0.998. In a test to differentiate benign lesions from healthy individuals, CXCL8 achieved sensitivity, specificity, and diagnostic test power equal to 82.1%, 75%, and AUC = 0.804 [68], respectively. A combination of three chemokines, CXCL8, CXCL9, and CCL22, was evaluated by Narita et al. as a discriminating tool for healthy individuals and those with breast cancer, obtaining a high value of AUC = 0.7771 [52]. These papers vary notably in their suggested diagnostic utility. However, the size of the groups and their specification should be considered. In our work [35], we focused exclusively on luminal subtypes of breast cancer, where the final count of breast cancer patients was 100 and 50 in the group of women with benign lesions and controls, respectively. By contrast, Khalaf et al. studied [68] 45 women with breast cancer, 25 women with benign lesions, and 20 healthy controls. The 45 women with breast cancer included all possible molecular subtypes of breast cancer, which, given the differences in concentration levels based on receptor expression, may have been a key impact on the results.

Reports on CXCL8 concentrations' behavior in relation to receptor status and clinical features are often contradictory. A few works showed that higher CXCL8 concentrations were present in patients with ER- breast cancer than ER+ types ($p < 0.0001$ [67], $p = 0.012$ [52]), HER2+ breast cancer type compared to HER2- ($p < 0.001$ [67]), and the TNBC subtype compared to non-TNBC ($p = 0.001$ [68]), but showed no difference in concentration for the PR receptor [67]. Studies by Tiainen et al., Wang, and Benoy showed no correlation between hormone receptor status and CXCL8 concentrations [35,66,68,70]. However, Koning et al. showed that CXCL8 levels were higher for PR- than PR+ breast cancer ($p = 0.033$ [71]; $p = 0.019$ [52]) among patients with no circulating tumor cells ($p = 0.017$) or grade 3 breast cancer ($p = 0.03$) [71]. Higher CXCL8 levels were associated with higher stages ($p < 0.0001$ [67]; $p < 0.001$ [66]), lymph node status ($p < 0.0068$ [66]), and presence of metastasis ($p < 0.05$ [65,67]; $p = 0.002$ [66]). CXCL8 levels did not correlate with age [66], menopause status [66,70], number of metastatic lesions [66,70], presence of visceral disease [66,70], grade [37], or occurrence of recurrence [37,66]. Among patients with current metastases, higher CXCL8 levels were associated with increased tumor load ($p < 0.0001$) and more rapid growth ($p = 0.0114$) [66]. Additionally, the correlation between CXCL8 and NTx levels indicated a marker of bone resorption ($p < 0.05$), confirming this chemokine's involvement in bone metastasis [65]. Serum CXCL8 concentrations were also an independent prognostic marker, indicating shorter overall survival for patients with higher CXCL8 concentrations ($p = 0.0045$ [66]; $p = 0.023$ [70]). Low CXCL8 concentrations in patients after

a course of chemotherapy were also associated with longer overall survival ($p < 0.001$) [70]. CXCL8 increased ($p < 0.05$) for patients whose duration of chemotherapy was prolonged, suggesting its involvement in cytostatic drug resistance [72].

5. Conclusions

Breast cancer is the most common malignancy affecting women. This disease is molecularly diverse but has a good prognosis if detected early enough. It is estimated that the 5-year survival rate of patients with stage I breast cancer is as high as 99%. A breast cancer diagnosis is primarily based on imaging examinations such as ultrasound, X-ray, or MRI, which have numerous limitations. Furthermore, the obtained results are confirmed invasively via biopsy. These methods translate into a longer diagnosis time, thus worsening the prognosis for women. There is considerable hope in new ancillary breast cancer diagnosis methods, which include the non-invasive determination of tumor markers from peripheral blood. Potential markers for breast cancer diagnosis include chemokines. This article summarizes existing knowledge about the roles of CXCL ELR-positive chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, and CXCL8 as peripheral blood and tissue markers in the diagnosis and prognosis of women with breast cancer.

Chemokines have been shown to mediate the pathogenesis of breast cancer. However, data on their potential use in diagnosing the disease are conflicting or contradictory. Although all CXCL ELR-positive chemokines are expressed in cancerous breast tissue, their expression may be elevated or downregulated compared to normal tissue. In addition, the mRNA levels of these chemokines are not always associated with the clinical features of breast cancer, or the data obtained by different research teams are mutually exclusive. We reached similar conclusions after analyzing data on CXCL ELR-positive chemokines' potential as markers in peripheral blood. Nevertheless, several compounds in this group show considerable potential as tissue or peripheral blood markers.

Establishing the unequivocal importance of CXCL ELR-positive chemokines in breast cancer requires more research. However, we believe that several compounds in this group show high potential. Based on our analysis of accumulated data, CXCL8 has preliminary high potential as a new diagnostic and prognostic marker, while CXCL2 and CXCL6 can be considered as prognostic markers. In the case of CXCL1 and CXCL5, however, we cannot determine their usefulness due to insufficient information.

Regarding TNBC, characterized by a particularly unfavorable prognosis, CXCL1, CXCL2, CXCL3, and CXCL8 are found to be strongly overexpressed relative to luminal types of breast cancer, suggesting that these chemokines can be used to differentiate cancer subtypes or as potential indirect therapeutic targets. The first studies of targeted therapies against individual chemokines did not show the expected efficacy [73,74] due to the multiligand character of their receptors. However, targeting the receiving point in the ligand-receptor signaling axis or using modified immune cells in therapy may result in the expected therapeutic effect, which may, unfortunately, result in severe side effects on the organism's healthy cells and tissue [75,76]. Nevertheless, new strategies such as modified cell therapy are worth the interest and may signify a breakthrough in treating breast cancer, especially the TNBC subtype.

Table 1. Summary table of ELR-positive CXC chemokines prognostic and diagnostic potential with dissected molecule source (circulating protein/tissue protein/tissue mRNA level).

Source		CXCL1								
		mRNA			Tissue protein			Blood circulating protein		
Expression/ Concentration towards HC	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	
Refs.	[45] *, [48] *	[51]	[45–50]	[43,44]	[49]		[36]	[35] **		

Table 1. Cont.

Expression/ Concentration towards BLC Ref.	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down
								[35] **	
Differences of level between BC subtypes Refs.	Yes [45,48,50– 52,54–56]		No [47]	Yes		No [43]	Yes		No
RFS when upregulated Ref.	Longer [47], [48] **	UA [48] ***, [50]	Shorter [43,45,55,57]	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
OS when upregulated Refs.	Longer	UA [47–50]	Shorter [45,55]	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter [33]
CXCL2									
Source	mRNA			Tissue protein			Blood circulating protein		
Expression/ Expression/ Concentration towards HC Refs.	Up	No diff.	Down [39,47,48,50, 58]	Up	No diff.	Down [49],	Up	No diff.	Down
Expression/ Concentration towards BLC Ref.	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down
Differences of level between BC subtypes Refs.	Yes [47,48,50,52, 57,58]		No	Yes		No	Yes		No
RFS when upregulated Ref.	Longer [47], [48] **, [50,58]	UA [48] ***	Shorter [58]	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
OS when upregulated Refs.	Longer [48,49,58]	UA [47,50]	Shorter	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
CXCL3									
Source	mRNA			Tissue protein			Blood circulating protein		
Expression/ Concentration towards HC Refs.	Up	No diff.	Down [39,47–50,58]	Up	No diff.	Down [49],	Up	No diff.	Down
Expression/ Concentration towards BLC Refs.	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down

Table 1. Cont.

Differences of level between BC subtypes	Yes		No	Yes		No	Yes		No
Refs.	[48,50,52,57,58]		[47]						
RFS when upregulated	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
Refs.	[47], [58] ** [50]	[48] ***	[57]						
OS when upregulated	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
Refs.		[47,50]	[48,49]						
CXCL5									
Source	mRNA			Tissue protein			Blood circulating protein		
Expression/Concentration towards HC	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down
Refs.		[50],	[47–49]	[60]	[49]		[60]		
Expression/Concentration towards BLC	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down
Ref.								[37]	
Differences of level between BC subtypes	Yes		No	Yes		No	Yes		No
Refs.	[48,50,55,57]		[47]						
RFS when upregulated	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
Refs.	[47,50]	[48,57]							
OS when upregulated	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
Refs.		[47–50]							
CXCL6									
Source	mRNA			Tissue protein			Blood circulating protein		
Expression/Concentration towards HC	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down
Refs.		[48,49,57]	[47,50,58]		[49]				
Expression/Concentration towards BLC	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down
Ref.									
Differences of level between BC subtypes	Yes		No	Yes		No	Yes		No
Refs.	[48,50]		[47]						
RFS when upregulated	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
Refs.	[47,50]	[48]							
OS when upregulated	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
Refs.	[48,49]	[47,50]							

Table 1. Cont.

CXCL7									
Source	mRNA			Tissue protein			Blood circulating protein		
Expression/ Concentration towards HC Refs.	Up	No diff. [48,49]	Down [47–50]	Up	No diff. [49]	Down	Up [62]	No diff.	Down
Expression/ Concentration towards BLC Ref.	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	Up	No diff. [37]	Down
Differences of level between BC subtypes Refs.	Yes		No [47,48]	Yes		No	Yes		No
RFS when upregulated Refs.	Longer [47,50]	UA [48]	Shorter	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
OS when upregulated Refs.	Longer	UA [47–50]	Shorter [61]	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter
CXCL8									
Source	mRNA			Tissue protein			Blood circulating protein		
Expression/ Concentration towards HC Refs.	Up [47,51]	No diff. [47–51]	Down [50]	Up [49]	No diff.	Down	Up [35] **, [52,66– 69]	No diff.	Down
Expression/ Concentration towards BLC Refs.	Up	No diff.	Down	Up	No diff.	Down	Up [37,68]	No diff. [35] **, [52]	Down
Differences of level between BC subtypes Refs.	Yes [47,48,50– 52,55,63]		No	Yes [64]		No [65]	Yes [52,67],		No [35] **, [66,68,70]
RFS when upregulated Refs.	Longer	UA [48] **	Shorter [47], [48] ***, [50]	Longer	UA	Shorter [64]	Longer	UA [37,66]	Shorter
OS when upregulated Ref.	Longer	UA	Shorter [47–50,63]	Longer	UA	Shorter	Longer	UA	Shorter [66,70]

BLC—benign lesion condition, HC—healthy condition, ND—no data, No diff.—no differences, OS—overall survival, Ref.—references, RFS—relapse free survival, red color *—for TNBC only, blue color **—for luminal BC only, green color ***—for ER-negative BC only, UA—unaffected.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15123118/s1>, Table S1: Histological classification of breast tumors. References [9,10] are cited in the Supplementary Materials.

Author Contributions: Conceptualization, J.M. and S.L.; writing—original draft preparation, J.M. and A.K.; writing—review and editing, M.K. and S.L.; visualization, J.M.; supervision, S.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a statutory grant of Medical University of Białystok.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Publicly available datasets were analyzed in this study. The data that support the findings of this study are available in PubMed and Google Scholar search.

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

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Giaquinto, A.N.; Sung, H.; Miller, K.D.; Kramer, J.L.; Newman, L.A.; Minihan, A.; Jemal, A.; Siegel, R.L. Breast Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 524–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Trieu, P.D.Y.; Mello-Thoms, C.R.; Barron, M.L.; Lewis, S.J. Look how far we have come: BREAST cancer detection education on the international stage. *Front. Oncol.* **2023**, *12*, 1023714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tadesse, G.F.; Tegaw, E.M.; Abdisa, E.K. Diagnostic performance of mammography and ultrasound in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *J. Ultrasound.* **2023**. *advance online publication.* [[CrossRef](#)]
5. O’Grady, S.; Morgan, M.P. Microcalcifications in breast cancer: From pathophysiology to diagnosis and prognosis. *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer* **2018**, *1869*, 310–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Seale, K.N.; Tkaczuk, K.H.R. Circulating Biomarkers in Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* **2022**, *22*, e319–e331. [[CrossRef](#)]
7. Do, H.T.T.; Lee, C.H.; Cho, J. Chemokines and their Receptors: Multifaceted Roles in Cancer Progression and Potential Value as Cancer Prognostic Markers. *Cancers* **2020**, *12*, 287. [[CrossRef](#)]
8. Masih, M.; Agarwal, S.; Kaur, R.; Gautam, P.K. Role of chemokines in breast cancer. *Cytokine* **2022**, *155*, 155909. [[CrossRef](#)]
9. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast Tumours. In *WHO Classification of Tumours*, 5th ed.; WHO Classification Editorial Board, Ed.; World Health Orgn: Lyon, France, 2019; Volume 2, pp. 5–12, 75–139.
10. Tan, P.H.; Ellis, I.; Allison, K.; Brogi, E.; Fox, S.B.; Lakhani, S.; Lazar, A.J.; Morris, E.A.; Sahin, A.; Salgado, R.; et al. WHO Classification of Tumours Editorial Board. 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology* **2020**, *77*, 181–185. [[CrossRef](#)]
11. 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](#)]
12. Nascimento, R.G.; Otoni, K.M. Histological and molecular classification of breast cancer: What do we know? *Mastology* **2020**, *30*, e20200024. [[CrossRef](#)]
13. Harbeck, N.; Penault-Llorca, F.; Cortes, J.; Gnant, M.; Houssami, N.; Poortmans, P.; Ruddy, K.; Tsang, J.; Cardoso, F. Breast cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*, 66. [[CrossRef](#)]
14. Giuliano, A.E.; Connolly, J.L.; Edge, S.B.; Mittendorf, E.A.; Rugo, H.S.; Solin, L.J.; Weaver, D.L.; Winchester, D.J.; Hortobagyi, G.N. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 290–303. [[CrossRef](#)]
15. Shao, Y.; Sun, X.; He, Y.; Liu, C.; Liu, H. Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133830. [[CrossRef](#)]
16. Gaughran, G.; Aggarwal, N.; Shadbolt, B.; Stuart-Harris, R. The utility of the tumor markers CA15.3, CEA, CA-125 and CA19.9 in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Manag.* **2020**, *9*, 4. [[CrossRef](#)]
17. AL-Azzawi, H.S.K.; Rasheed, M.K.; AL-Naqqash, M. CA 27-29: A Valuable Marker for Breast Cancer Management in Correlation with CA 15-3. *Indian J. Forensic Med. Toxicol.* **2020**, *14*, 1615–1621.
18. Huebner, H.; Häberle, L.; Müller, V.; Schrader, I.; Lorenz, R.; Forstbauer, H.; Fink, V.; Schochter, F.; Bekes, I.; Mahner, S.; et al. MUC1 (CA27.29) before and after Chemotherapy and Prognosis in High-Risk Early Breast Cancer Patients. *Cancers* **2022**, *14*, 1721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Duffy, M.J.; Evoy, D.; McDermott, E.W. CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411*, 1869–1874. [[CrossRef](#)]
20. Lucarelli, G.; Rutigliano, M.; Loizzo, D.; di Meo, N.A.; Lasorsa, F.; Mastropasqua, M.; Maiorano, E.; Bizzoca, C.; Vincenti, L.; Battaglia, M.; et al. MUC1 Tissue Expression and Its Soluble Form CA15-3 Identify a Clear Cell Renal Cell Carcinoma with Distinct Metabolic Profile and Poor Clinical Outcome. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13968. [[CrossRef](#)]

21. Gomes, P.S.; Soares, M.R.; Marchenta, M.F.M.L.; Meirelles, G.S.P.; Ferreira, R.G.; Botelho, A.B.; Martins, R.B.; Pereira, C.A.C. Carbohydrate antigen 15-3 as a marker of disease severity in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis. *J. Bras. Pneumol.* **2021**, *47*, e20200589. [CrossRef]
22. Moll, S.A.; Wiertz, I.A.; Vorselaars, A.D.; Zanen, P.; Ruven, H.J.; van Moorsel, C.H.; Grutters, J.C. Serum biomarker CA 15-3 as predictor of response to antifibrotic treatment and survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biomark. Med.* **2020**, *14*, 997–1007. [CrossRef] [PubMed]
23. Hall, C.; Clarke, L.; Pal, A.; Buchwald, P.; Eglinton, T.; Wakeman, C.; Frizelle, F. A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice. *Ann. Coloproctol.* **2019**, *35*, 294–305. [CrossRef] [PubMed]
24. Kabel, A.M. Tumor markers of breast cancer: New perspectives. *J. Oncol. Sci.* **2017**, *3*, 5–11. [CrossRef]
25. Admoun, C.; Mayrovitz, H.N. The Etiology of Breast Cancer. In *Breast Cancer*; Mayrovitz, H.N., Ed.; Exon Publications: Brisbane, Australia, 2022. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583809/> (accessed on 9 January 2021).
26. Sun, Y.S.; Zhao, Z.; Yang, Z.N.; Xu, F.; Lu, H.J.; Zhu, Z.Y.; Shi, W.; Jiang, J.; Yao, P.P.; Zhu, H.P. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2017**, *13*, 1387–1397. [CrossRef]
27. Momenimovahed, Z.; Salehiniya, H. Epidemiological characteristics and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer* **2019**, *11*, 151–164. [CrossRef]
28. Zlotnik, A.; Burkhardt, A.M.; Homey, B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 597–606. [CrossRef]
29. Legler, D.F.; Thelen, M. Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function. *Chimia* **2016**, *70*, 856–859. [CrossRef]
30. Nagarsheth, N.; Wicha, M.S.; Zou, W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 559–572. [CrossRef]
31. Raza, S.; Rajak, S.; Tewari, A.; Gupta, P.; Chattopadhyay, N.; Sinha, R.A.; Chakravarti, B. Multifaceted role of chemokines in solid tumors: From biology to therapy. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *86*, 1105–1121. [CrossRef]
32. Będkowska, G.E.; Gacuta, E.; Zbucka-Krętowska, M.; Ławicki, P.; Szmitkowski, M.; Lemancewicz, A.; Motyka, J.; Kobus, A.; Choraży, M.; Paniczko, M.; et al. Plasma Levels and Diagnostic Utility of VEGF in a Three-Year Follow-Up of Patients with Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 5452. [CrossRef]
33. Divella, R.; Daniele, A.; Savino, E.; Palma, F.; Bellizzi, A.; Giotta, F.; Simone, G.; Lioce, M.; Quaranta, M.; Paradiso, A.; et al. Circulating levels of transforming growth factor- β (TGF- β) and chemokine (C-X-C motif) ligand-1 (CXCL1) as predictors of distant seeding of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 1491–1497.
34. Zajkowska, M.; Gacuta, E.; Kozłowska, S.; Lubowicka, E.; Głażewska, E.K.; Chrostek, L.; Szmitkowski, M.; Pawłowski, P.; Zbucka-Krętowska, M.; Ławicki, S. Diagnostic power of VEGF, MMP-9 and TIMP-1 in patients with breast cancer. A multivariate statistical analysis with ROC curve. *Adv. Med. Sci.* **2019**, *64*, 1–8. [CrossRef]
35. Motyka, J.; Gacuta, E.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Ławicki, P.; Ławicki, S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 6694. [CrossRef]
36. Ma, K.; Yang, L.; Shen, R.; Kong, B.; Chen, W.; Liang, J.; Tang, G.; Zhang, B. Th17 cells regulate the production of CXCL1 in breast cancer. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *56*, 320–329. [CrossRef]
37. Wang, J.; He, Q.; Shao, Y.G.; Ji, M. Chemokines fluctuate in the progression of primary breast cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2013**, *17*, 596–608.
38. Piskór, B.M.; Przylipiak, A.; Dąbrowska, E.; Sidorkiewicz, I.; Niczyporuk, M.; Szmitkowski, M.; Ławicki, S. Plasma Concentrations of Matrixins MMP-7 and MMP-26 as Diagnostic Biomarkers in Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1436. [CrossRef]
39. Kwon, M.J. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in breast cancer. *Front Oncol.* **2023**, *12*, 1108695. [CrossRef]
40. Ławicki, P.; Malinowski, P.; Motyka, J.; Ławicki, M.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Gacuta, E.; Guszczyń, T.; Januszkiewicz, M.; Zbucka-Krętowska, M.; et al. Plasma Levels of Metalloproteinase 3 (MMP-3) and Metalloproteinase 7 (MMP-7) as New Candidates for Tumor Biomarkers in Diagnostic of Breast Cancer Patients. *J Clin Med.* **2023**, *12*, 2618. [CrossRef]
41. Allen, M.; Louise Jones, J. Jekyll and Hyde: The role of the microenvironment on the progression of cancer. *J. Pathol.* **2011**, *223*, 162–176. [CrossRef]
42. Lin, H.J.; Liu, Y.; Lofland, D.; Lin, J. Breast Cancer Tumor Microenvironment and Molecular Aberrations Hijack Tumoricidal Immunity. *Cancers* **2022**, *14*, 285. [CrossRef]
43. Zou, A.; Lambert, D.; Yeh, H.; Yasukawa, K.; Behbod, F.; Fan, F.; Cheng, N. Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF- β signaling proteins. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 781. [CrossRef] [PubMed]
44. Acharyya, S.; Oskarsson, T.; Vanharanta, S.; Malladi, S.; Kim, J.; Morris, P.G.; Manova-Todorova, K.; Leversha, M.; Hogg, N.; Seshan, V.E.; et al. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* **2012**, *150*, 165–178. [CrossRef] [PubMed]
45. Wang, N.; Liu, W.; Zheng, Y.; Wang, S.; Yang, B.; Li, M.; Song, J.; Zhang, F.; Zhang, X.; Wang, Q.; et al. CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 880. [CrossRef] [PubMed]
46. Berger, A.C.; Korkut, A.; Kanchi, R.S.; Hegde, A.M.; Lenoir, W.; Liu, W.; Liu, Y.; Fan, H.; Shen, H.; Ravikumar, V.; et al. A Comprehensive Pan-Cancer Molecular Study of Gynecologic and Breast Cancers. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 690–705.e9. [CrossRef]

47. Chen, E.; Qin, X.; Peng, K.; Xu, X.; Li, W.; Cheng, X.; Tang, C.; Cui, Y.; Wang, Z.; Liu, T. Identification of Potential Therapeutic Targets Among CXC Chemokines in Breast Tumor Microenvironment Using Integrative Bioinformatics Analysis. *Cell Physiol. Biochem.* **2018**, *45*, 1731–1746. [CrossRef]
48. Li, Y.; Liang, M.; Lin, Y.; Lv, J.; Chen, M.; Zhou, P.; Fu, F.; Wang, C. Transcriptional Expressions of CXCL9/10/12/13 as Prognosis Factors in Breast Cancer. *J. Oncol.* **2020**, *2020*, 4270957. [CrossRef]
49. Li, L.; Yao, W.; Yan, S.; Dong, X.; Lv, Z.; Jing, Q.; Wang, Q.; Ma, B.; Hao, C.; Xue, D.; et al. Pan-Cancer Analysis of Prognostic and Immune Infiltrates for CXCs. *Cancers* **2021**, *13*, 4153. [CrossRef]
50. Hozhabri, H.; Moghaddam, M.M.; Moghaddam, M.M.; Mohammadian, A. A comprehensive bioinformatics analysis to identify potential prognostic biomarkers among CC and CXC chemokines in breast cancer. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 10374. [CrossRef]
51. Bild, A.H.; Yao, G.; Chang, J.T.; Wang, Q.; Potti, A.; Chasse, D.; Joshi, M.B.; Harpole, D.; Lancaster, J.M.; Berchuck, A.; et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* **2006**, *439*, 353–357. [CrossRef]
52. Narita, D.; Seclaman, E.; Anghel, A.; Ilina, R.; Cireap, N.; Negru, S.; Sirbu, I.O.; Ursoniu, S.; Marian, C. Altered levels of plasma chemokines in breast cancer and their association with clinical and pathological characteristics. *Neoplasma* **2016**, *63*, 141–149. [CrossRef]
53. Pawitan, Y.; Bjöhle, J.; Amler, L.; Borg, A.L.; Egyhazi, S.; Hall, P.; Han, X.; Holmberg, L.; Huang, F.; Klaar, S.; et al. Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: Derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Res.* **2005**, *7*, R953–R964. [CrossRef]
54. Sørlie, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10869–10874. [CrossRef]
55. SenGupta, S.; Hein, L.E.; Xu, Y.; Zhang, J.; Konwerski, J.R.; Li, Y.; Johnson, C.; Cai, D.; Smith, J.L.; Parent, C.A. Triple-Negative Breast Cancer Cells Recruit Neutrophils by Secreting TGF- β and CXCR2 Ligands. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 659996. [CrossRef]
56. Yang, C.; Yu, H.; Chen, R.; Tao, K.; Jian, L.; Peng, M.; Li, X.; Liu, M.; Liu, S. CXCL1 stimulates migration and invasion in ER negative breast cancer cells via activation of the ERK/MMP2/9 signaling axis. *Int. J. Oncol.* **2019**, *55*, 684–696. [CrossRef]
57. Bièche, I.; Chavey, C.; Andrieu, C.; Busson, M.; Vacher, S.; Le Corre, L.; Guinebretière, J.M.; Burlincho, S.; Lidereau, R.; Lazennec, G. CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer. *Endocr.-Relat. Cancer* **2007**, *14*, 1039–1052. [CrossRef]
58. An, J.X.; Chen, Y.Y.; Ma, Z.S.; Yu, W.J.; Hu, J.X.; Cao, F.L. CXCL2 as a Prognostic Marker in Breast Cancer is Associated with Immune Infiltration and Regulated by miR-215. 14 July 2020, Preprint, 1st Version. Available online: <https://www.researchsquare.com/article/rs-41001/v1> (accessed on 20 January 2021).
59. See, A.L.; Chong, P.K.; Lu, S.Y.; Lim, Y.P. CXCL3 is a potential target for breast cancer metastasis. *Curr. Cancer Drug Targets* **2014**, *14*, 294–309. [CrossRef]
60. Li, X.; Wang, M.; Gong, T.; Lei, X.; Hu, T.; Tian, M.; Ding, F.; Ma, F.; Chen, H.; Liu, Z. A S100A14-CCL2/CXCL5 signaling axis drives breast cancer metastasis. *Theranostics* **2020**, *10*, 5687–5703. [CrossRef]
61. Wang, Y.H.; Shen, C.Y.; Lin, S.C.; Kuo, W.H.; Kuo, Y.T.; Hsu, Y.L.; Wang, W.C.; Lin, K.T.; Wang, L.H. Monocytes secrete CXCL7 to promote breast cancer progression. *Cell. Death Dis.* **2021**, *12*, 1090. [CrossRef]
62. Kosir, M.A.; Ju, D. Serum chemokine CXCL7 activity after resection of breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, e22182. [CrossRef]
63. Fang, Q.I.; Wang, X.; Luo, G.; Yu, M.; Zhang, X.; Xu, N. Increased CXCL8 Expression Is Negatively Correlated with the Overall Survival of Patients with ER-Negative Breast Cancer. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 4845–4852.
64. Milovanovic, J.; Todorovic-Rakovic, N.; Abu Rabi, Z. The prognostic role of interleukin-8 (IL-8) and matrix metalloproteinases -2 and -9 in lymph node-negative untreated breast cancer patients. *J. BUON* **2013**, *18*, 866–873. [PubMed]
65. Kamalakar, A.; Bendre, M.S.; Washam, C.L.; Fowler, T.W.; Carver, A.; Dilley, J.D.; Bracey, J.W.; Akel, N.S.; Margulies, A.G.; Skinner, R.A.; et al. Circulating interleukin-8 levels explain breast cancer osteolysis in mice and humans. *Bone* **2014**, *61*, 176–185. [CrossRef] [PubMed]
66. Benoy, I.H.; Salgado, R.; Van Dam, P.; Geboers, K.; Van Marck, E.; Scharpé, S.; Vermeulen, P.B.; Dirix, L.Y. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7157–7162. [CrossRef] [PubMed]
67. Ma, Y.; Ren, Y.; Dai, Z.J.; Wu, C.J.; Ji, Y.H.; Xu, J. IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2017**, *26*, 421–426. [CrossRef] [PubMed]
68. Khalaf, A.F.; Al-naqqash, M.A.; Alawn, N.A.; Ad’hiah, A.H. Biomarker Significance of Serum CXCL8, CXCL10 and CXCL16 in Breast Tumors of Iraqi Patients. *Baghdad Sci. J.* **2020**, *17*, 0199. [CrossRef]
69. Celik, B.; Yalcin, A.D.; Genc, G.E.; Bulut, T.; Kuloglu Genc, S.; Gumuslu, S. CXCL8, IL-1 β and sCD200 are pro-inflammatory cytokines and their levels increase in the circulation of breast carcinoma patients. *Biomed. Rep.* **2016**, *5*, 259–263. [CrossRef]
70. Tiainen, L.; Hämäläinen, M.; Luukkaala, T.; Tanner, M.; Lahdenperä, O.; Vihinen, P.; Jukkola, A.; Karihtala, P.; Moilanen, E.; Kellokumpu-Lehtinen, P.L. Low Plasma IL-8 Levels During Chemotherapy Are Predictive of Excellent Long-Term Survival in Metastatic Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* **2019**, *19*, e522–e533. [CrossRef]
71. König, A.; Vilsmaier, T.; Rack, B.; Friese, K.; Janni, W.; Jeschke, U.; Andergassen, U.; Trapp, E.; Jückstock, J.; Jäger, B.; et al. Determination of Interleukin-4, -5, -6, -8 and -13 in Serum of Patients with Breast Cancer Before Treatment and its Correlation to Circulating Tumor Cells. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 3123–3130.

72. Zhuang, X.; Wang, J. Correlations of MRP1 gene with serum TGF- β 1 and IL-8 in breast cancer patients during chemotherapy. *J. BUON* **2018**, *23*, 1302–1308.
73. Salcedo, R.; Martins-Green, M.; Gertz, B.; Oppenheim, J.J.; Murphy, W.J. Combined administration of antibodies to human interleukin 8 and epidermal growth factor receptor results in increased antimetastatic effects on human breast carcinoma xenografts. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2655.
74. Kerbel, R.S.; Yu, J.; Tran, J.; Man, S.; Vilorio-Petit, A.; Klement, G.; Coomber, B.L.; Rak, J. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: Implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev.* **2001**, *20*, 79–86. [[CrossRef](#)]
75. Ruffini, P.A. The CXCL8-CXCR1/2 Axis as a Therapeutic Target in Breast Cancer Stem-Like Cells. *Front Oncol.* **2019**, *9*, 40. [[CrossRef](#)]
76. Nasiri, F.; Kazemi, M.; Mirarefin, S.M.J.; Mahboubi Kancha, M.; Ahmadi Najafabadi, M.; Salem, F.; Dashti Shokoohi, S.; Evazi Bakhshi, S.; Safarzadeh Kozani, P.; Safarzadeh Kozani, P. CAR-T cell therapy in triple-negative breast cancer: Hunting the invisible devil. *Front Immunol.* **2022**, *13*, 1018786. [[CrossRef](#)]

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.

Rozdział 9.
**Publikacja 2. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1)
and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal
A and B Breast Cancer**

Autorzy: Motyka Joanna, Gacuta Ewa, Kicman Aleksandra, Kulesza Monika, Ławicki Paweł,
Ławicki Sławomir

Czasopismo: Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(22), s. 6694.

Numer DOI: 10.3390/jcm11226694

IF: 3.900; **MNiSW:** 140 punktów

Dyscypliny naukowe czasopisma: inżynieria biomedyczna, biologia medyczna, nauki farmaceutyczne, nauki medyczne, nauki o kulturze fizycznej, nauki o zdrowiu, nauki o rodzinie, technologia żywności i żywienia, biotechnologia, nauki chemiczne, weterynaria



Article

Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer

Joanna Motyka ^{1,*} , Ewa Gacuta ², Aleksandra Kicman ³ , Monika Kulesza ¹, Paweł Ławicki ¹ and Sławomir Ławicki ¹

¹ Department of Population Medicine and Lifestyle Diseases Prevention, Medical University of Białystok, 15-269 Białystok, Poland

² Department of Gynecology and Gynecological Oncology, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland

³ Department of Aesthetic Medicine, Medical University of Białystok, 15-267 Białystok, Poland

* Correspondence: joanna.motyka@sd.umb.edu.pl



Citation: Motyka, J.; Gacuta, E.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Ławicki, P.; Ławicki, S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 6694. <https://doi.org/10.3390/jcm11226694>

Academic Editors: Maria Lina Tornesello and Simona Zaami

Received: 5 September 2022

Accepted: 10 November 2022

Published: 12 November 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: Chemokines are involved in the regulation of immune balance and in triggering an immune response. CXCL1 and CXCL8 belong to the ELR-motif-containing group of CXC chemokines, which, in breast cancer (BC), stimulate angiogenesis and increase migration and invasiveness of tumor cells. The aim of this study was to evaluate CXCL1, CXCL8 and comparative marker CA 15-3 plasma concentrations in BC patients with luminal subtypes A and B. The study group consisted of 100 patients with BC, and the control group of 50 subjects with benign breast lesions and 50 healthy women. Chemokines concentrations were determined by ELISA method; CA15-3-by CMIA. Concentrations of CXCL8 and CA15-3 were significantly higher in BC total group and luminal B (for CA15-3 also in luminal A) subtype of BC than in healthy controls and subjects with benign lesions. In the total BC group, the highest SE, PPV and NPV were observed for CXCL8 (70%, 77.78%, 50%, resp.). A combined analysis of tested chemokines with CA 15-3 increased SE and NPV values (96%, 69.23%, resp.). The diagnostic power of the test (measured by area under ROC curve (AUC)) showed the highest value for CXCL8 in the total BC group (0.6410), luminal A (0.6120) and B subgroup of BC (0.6700). For the combined parameter, the AUC was increasing and reached the highest value for CXCL1 + CXCL8 + CA15-3 combination (0.7024). In light of these results, we suggest that CXCL8 could be used as an additional diagnostic marker that would positively influence the diagnostic utility of CA 15-3, especially in luminal B subtype of BC.

Keywords: breast cancer; *adenocarcinoma ductale*; luminal A; luminal B; chemokines; CXCL1; CXCL8; CA 15-3; plasma concentration; *fibroadenoma*

1. Introduction

Breast cancer is the most frequent malignancy affecting women, with more than 2 million new cases per year worldwide and more than 620,000 deaths. BC belongs to a highly heterogeneous group of cancers, which results in a great diversity in its development, course and response to treatment [1]. The key moment for every patient is the earliest possible diagnosis of a cancerous lesion and monitoring its development. Current breast cancer diagnosis is mainly based on imaging, genetic and biochemical examinations. The implementation of screening mammography, improvements in systemic adjuvant therapy, and the introduction of targeted therapy led to a reduction in breast cancer mortality in developed countries against an ever-increasing number of newly diagnosed cases [2,3]. However, early detection of this cancer still remains a major challenge for health services. The diagnostic process is also aided by the determination of tumor markers in peripheral blood. The routine markers used for breast cancer are CA 15-3 and, less commonly, CA 27.29

or CEA, but because of their insufficient diagnostic sensitivity and specificity, especially in early stages of breast cancer, they are not sufficient to establish diagnosis. Nevertheless, CA 15-3 has found its use as a marker in predicting the course of the disease and the incidence of metastasis, and in monitoring the effectiveness of treatment [4]. Therefore, further research is being conducted to find markers whose concentrations could better correlate with the presence or stage of the disease. Such biomarkers are currently being sought among enzymes, hormones, chemokines and circulating RNA or DNA fragments [5–7].

The incidence of breast cancer is influenced by many interrelated factors, such as genetic and environmental factors, hormonal management, and lifestyle [7]. Other factors that have been found to predispose to cancer include chronic inflammation [8]. Disturbances in the expression of chemokines, as molecules involved in the regulation of inflammation, may contribute to an increased risk of breast cancer. They are also molecules that influence the process of carcinogenesis through interactions with chemokine receptors, directing cells towards proliferation, differentiation, invasion or metastasis. The overexpression of chemokines and their receptors has been demonstrated in various types of malignancies, including breast cancer [9,10]. CXCL1 and CXCL8 belong to the CXC chemokine family [10]. An abnormal expression of CXCL1 and CXCL8 has been found in many types of malignancies, including breast cancer. These chemokines are associated with the endothelial–neoplastic–matrix signaling network, regulation of inflammatory mediators, and interference in breast cancer development by controlling cell adhesion, angiogenesis, proliferation, migration and metastasis. Additionally, CXCL8 also enhances cancers by controlling stem cell mass, and CXCL1 is associated with the occurrence of drug resistance [11–22]. CXCL1 shows increased expression in the BC tumor stroma and its plasma levels have been linked to the number of circulating tumor cells [23,24]. Higher CXCL8 mRNA levels in breast cancer tissues were associated with significantly shorter overall survival [25]. CXCL8 is also overexpressed in breast cancer and positively correlates with inflammatory cell activity, which may account for the aggressiveness of these tumors [26].

In the present study, we investigated the plasma concentrations of CXCL1 and CXCL8 in female breast cancer patients as potential tumor markers in the diagnostic process, as an individual or combined parameter with the routinely used marker CA 15-3. In addition, we evaluated the concentrations of these chemokines among patients with benign breast lesions, as well as changes in plasma concentrations of the studied parameters before and after surgical treatment for BC patients.

2. Materials and Methods

We included a group of 100 patients with ductal adenocarcinoma breast cancer, *adenocarcinoma ductale* (BC-total), of luminal subtypes A and B, who underwent diagnosis and subsequent surgical treatment at the Bialystok Oncology Center in Poland. Histopathological evaluation and receptor status subtyping of breast lesions were performed at the hospital diagnostic stage on the basis of preoperative breast tumor biopsy or intraoperatively taken biopsy specimens. Patients for the study were divided into groups according to the receptor subtype into the subgroup of breast cancers with luminal subtype A (BC—Lum A) and the sub-group of breast cancers with luminal subtype B (BC—Lum B).

The control group consisted of 50 subjects with benign breast lesions, *fibroadenoma*, and 50 healthy women age-matched to the study. Detailed characteristics of studied groups are presented in Table 1.

The selection of the study and control groups, the preoperative and postoperative therapeutic management were carried out by the hospital unit in accordance with current clinical practice guidelines for the treatment of breast cancer. Patients with malignant lesions who received adjuvant preoperative treatment were excluded from the study. Patients with breast cancer underwent breast-conserving treatment with sentinel node evaluation or mastectomy, depending on the stage of the lesion. Pathomorphological assessment of the lesion included evaluation of the degree of malignancy and molecular

features (evaluation of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) expression, HER-2 receptor status and evaluation of Ki-67 proliferation index).

Table 1. Characteristics of examined groups: breast cancer (BC-total) group of patients with selected subgroups for analysis, comparison group of subjects with benign breast lesions and control group of healthy women.

Studied Group	Group Size	Menopausal Status		Age (Median) (Min–Max)	TNM Status (Number of Incidents)	Treatment (Number of Incidents)	
		Premeno-Pausal	Postmeno-Pausal				
Preoperative group of patients							
Breast cancer total group:	100	11	89	60 (21–85)	T1N0M0 (51) T1cN0M0 (3) T1N0Mx (2) T1NxM0 (9) T1N1M0 (1)	T2N0M0 (24) T2NxM0 (4) T2N1M0 (4) T3N0M0 (1) T4N0M0 (1)	BCT + ALND (69) BCT (4) Amputation + ALND (27)
Luminal A	50	8	42	58 (21–81)	T1N0M0 (27) T1N0Mx (2) T1cN0M0 (2) T1NxM0 (7)	T2N0M0 (10) T2NxM0 (1) T3N0M0 (1)	BCT + ALND (37) Amputation + ALND (13)
Luminal B	50	3	47	62.5 (38–79)	T1N0M0 (24) T1cN0M0 (1) T1NxM0 (2) T1N1M0 (1)	T2N0M0 (14) T2NxM0 (3) T2N1M0 (4) T4N0M0 (1)	BCT + ALND (32) BCT (4)Amputation + ALND (14)
Postoperative group of patients (matched pairs)							
Breast cancer total group:	43	3	40	61 (35–81)	T1N0M0 (25) T1cN0M0 (1) T1N0Mx (1) T1NxM0 (4)	T2N0M0 (8) T2NxM0 (2) T2N1M0 (1) T4N0M0 (1)	BCT + ALND (33) Amputation + ALND (10)
Luminal A	22	1	21	62 (35–81)	T1N0M0 (13) T1N0Mx (1) T1cN0M0 (1)	T1NxM0 (3)T2N0M0 (4)	BCT + ALND (19) Amputation + ALND (3)
Luminal B	21	2	19	60 (38–79)	T1N0M0 (12) T1NxM0 (1) T2N0M0 (4)	T2NxM0 (2) T2N1M0 (1) T4N0M0 (1)	BCT + ALND (14) Amputation + ALND (7)
Control groups							
Benign breast lesion group	50	12	38	50 (22–83)	<i>Fibroadenoma</i>		N/A
Healthy women group	50	10	40	49.5 (25–69)	N/A		N/A

ALND—axillary lymph node dissection; BCT—breast-conserving treatment; N/A—not applicable.

Postoperative evaluation of the concentrations of studied parameters was performed in the material obtained from BC patients 6–8 weeks after the performed surgical treatment, at the control moment before the introduction of further treatment with radiotherapy and/or chemotherapy.

We qualified patients with breast cancer or a benign lesion on the basis of gynecological examinations, followed by confirmatory examinations by the oncologist on the basis of imaging studies (mammography/USG/magnetic resonance imaging) and laboratory tests.

The healthy women included in the control group were volunteers who were qualified to participate in the study by a family doctor, and then a gynecologist of the University Clinical Hospital in Bialystok, Poland and participants of the Bialystok PLUS cohort study, in whom a detailed imaging diagnosis (abdominal ultrasound/magnetic resonance) and

evaluation of laboratory results were performed, on the basis of which the gynecologist subsequently determined the possibility of inclusion in the study.

The study material was plasma obtained from venous blood collected for the anticoagulant lithium heparin. Venous blood was collected from the participants and centrifuged at $1810 \times g$ for 10 min. The centrifuged plasma was then pooled and stored at -85°C until the day of the assay.

We measured plasma CXCL1 and CXCL8 concentrations with the use of immunoenzymatic ELISA method (Quantikine ELISA Human CXCL1/GRO α and Quantikine ELISA IL-8/CXCL8, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). The assays were performed according to the manufacturer's instructions provided with the kits, using double-sample determinations for the standard curve and tested samples. Intra-assay and inter-assay precision were determined by the manufacturer (CXCL1 2.4%, 4.7%; CXCL8 5.4%, 9.7%, respectively). For the measurement of CA 15-3 levels, we used a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) (Abbott, Chicago, IL, USA) according to the manufacturer's protocols.

Statistical Analysis

The analysis of obtained parameters was performed using PQStat ver.1.8.2 PQStat Software, (Poznan, Poland) and GraphPad Prism 9.3.1. for Windows, GraphPad Software, (San Diego, CA, USA).

After the evaluation of the normality of the distribution for the tested parameters with the Shapiro–Wilk test, which revealed significant deviations from the normal distribution, we performed statistical analysis using nonparametric tests. To assess statistical differences between two independent groups, we used the Mann–Whitney U test, whereas, when comparing between multiple groups, we used the Kruskal–Wallis's test with the Conover–Iman post-hoc test. Comparisons between concentrations of studied parameters for paired measurements (preoperative period and 6–8 weeks since the procedure) were made with the Wilcoxon test for dependent pairs. Due to the insufficient number of premenopausal women in the study groups, we refrained from assessing the influence of this parameter on the obtained results.

For the evaluation of the diagnostic features of the tested parameters: diagnostic sensitivity (SE), diagnostic specificity (SP), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and diagnostic power, our analysis was performed on the basis of the area under the ROC curve (AUC) and the optimal cut-off points determined by the closest distance to corner method, which were, respectively: 34.44 pg/mL for CXCL1, 3.71 pg/mL for CXCL8 and 17.8 IU/mL for CA 15-3.

3. Results

3.1. Evaluation of Menopausal Status Influence on Constructed Groups

In order to assess the effect of the patients' menopausal status on the analysis of the results in each group, we performed a comparison with the Mann–Whitney U test. Due to the low number of premenopausal patients, we decided to compare the individual groups selected throughout the study (BC-total group, luminal A and luminal B subgroups of BC, benign breast lesion group, healthy women group) with the same alternative groups, from which only patients with premenopausal status were excluded. This analysis did not reveal any significant differences between the analyzed groups (data not shown). However, we decided to perform an additional individual evaluation of the diagnostic features for only postmenopausal subjects of our research.

3.2. Preoperative Concentrations

Plasma levels of tested parameters among all groups are presented in Figures 1–3. Statistical analysis showed that BC-total patients had significantly higher concentrations of CXCL-8 (median 5.36 pg/mL) compared to healthy women (2.88 pg/mL, $p = 0.005$) and subjects with benign lesion (3.50 pg/mL, $p = 0.033$). Analyzing concentrations of

comparative marker CA 15-3, we also noticed a higher concentration among all patients with BC (median 18.65 IU/mL) than among healthy women (15.05 IU/mL, $p = 0.007$), as well as among patients with benign lesion (15.2 IU/mL, $p = 0.019$).

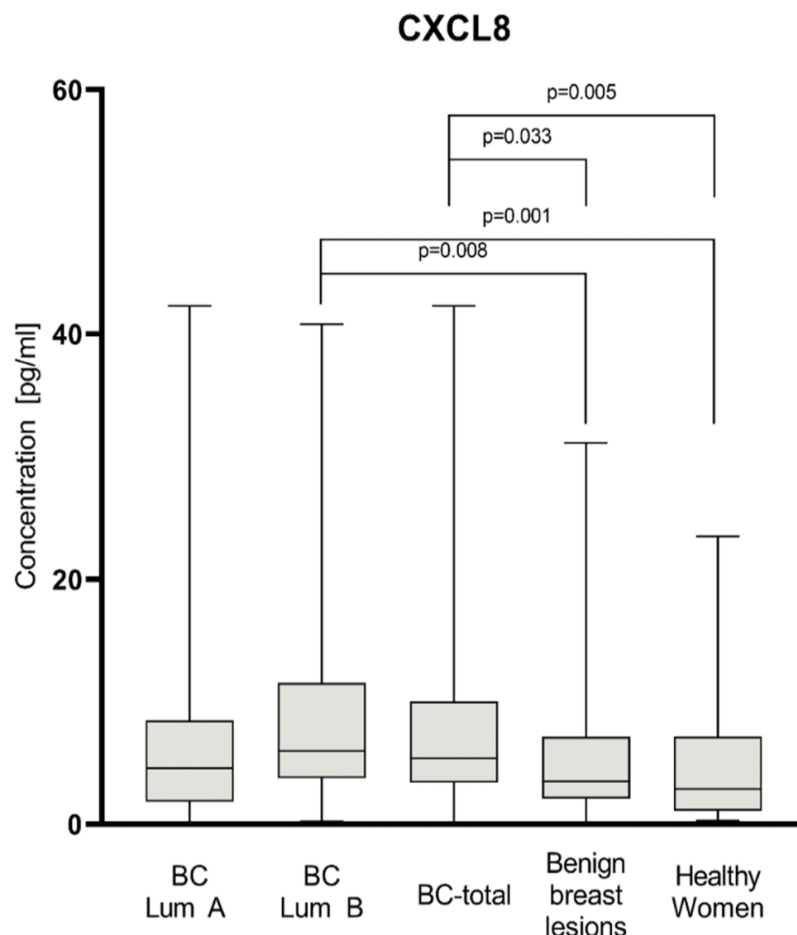


Figure 1. Plasma concentrations of CXCL8 of patients with BC (total group and subgroups), subjects with benign breast lesion and healthy women with highlighted statistically significant differences.

In the group of BC patients with luminal subtype A, we found significantly higher concentrations for CA 15-3 (18.55 IU/mL) compared to the group of healthy women ($p = 0.027$). In the group of BC patients with luminal subtype B, concentrations of all parameters maintained the same relation as the BC-total group. CXCL8 concentrations were significantly higher in luminal B subtype of BC (5.95 pg/mL) than among healthy women ($p = 0.001$) and subjects with benign lesion ($p = 0.008$). CA 15-3 concentrations in patients with luminal B subtype of BC (19.2 IU/mL) were also significantly higher than in the group of healthy women ($p = 0.013$) and subjects with benign lesion ($p = 0.03$). CXCL1 did not show any significant statistical differences in concentrations in all study groups. In the BC group of patients with luminal subtype B, the median concentrations of CXCL8 (5.95 pg/mL), CXCL1 (33.55 pg/mL), and CA 15-3 (19.2 IU/mL) were higher than in the group of patients with luminal subtype A (4.57 pg/mL; 27.83 pg/mL; 18.55 IU/mL, respectively); however, the used test did not show these correlations as statistically significant.

Using r Spearman's non-parametric test, we examined the correlations between the studied parameters, but we did not find any significant correlations between CXCL1, nor between CXCL8 and the comparative marker CA 15-3, in any of the study groups. Correlations between tested chemokines and CA 15-3 are reflected by scatterplots on Figure 4.

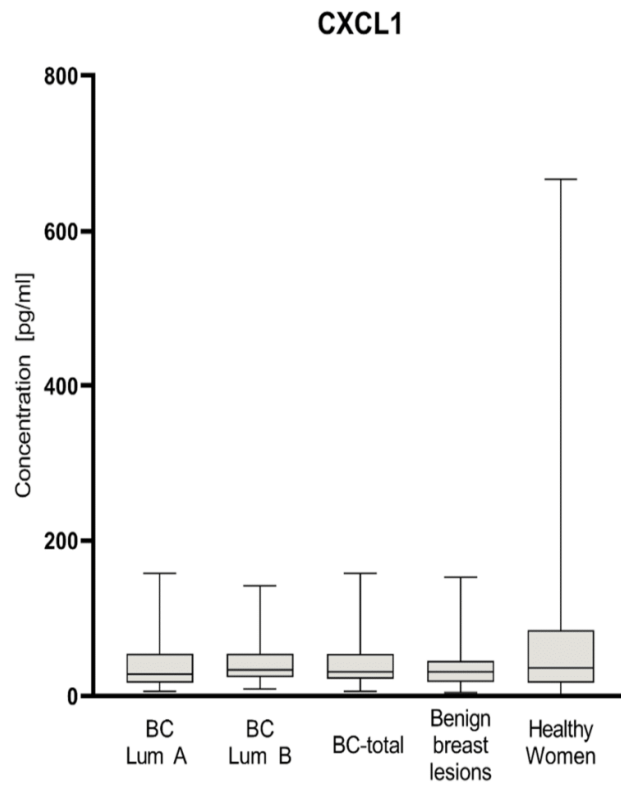


Figure 2. Plasma concentrations of CXCL1 of patients with BC (total group and subgroups), subjects with benign breast lesion and healthy women.

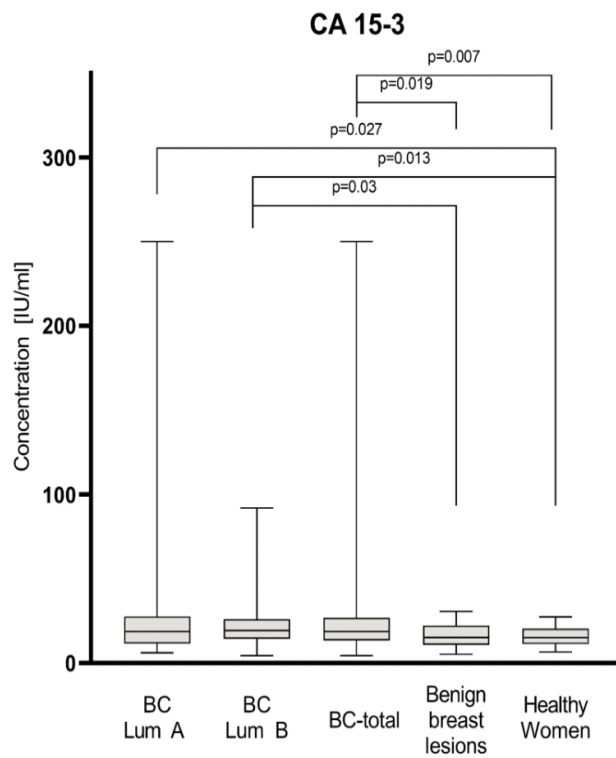


Figure 3. Plasma concentrations of CA 15-3 of patients with BC (total group and subgroups), subjects with benign breast lesion and healthy women, with statistically significant differences highlighted.

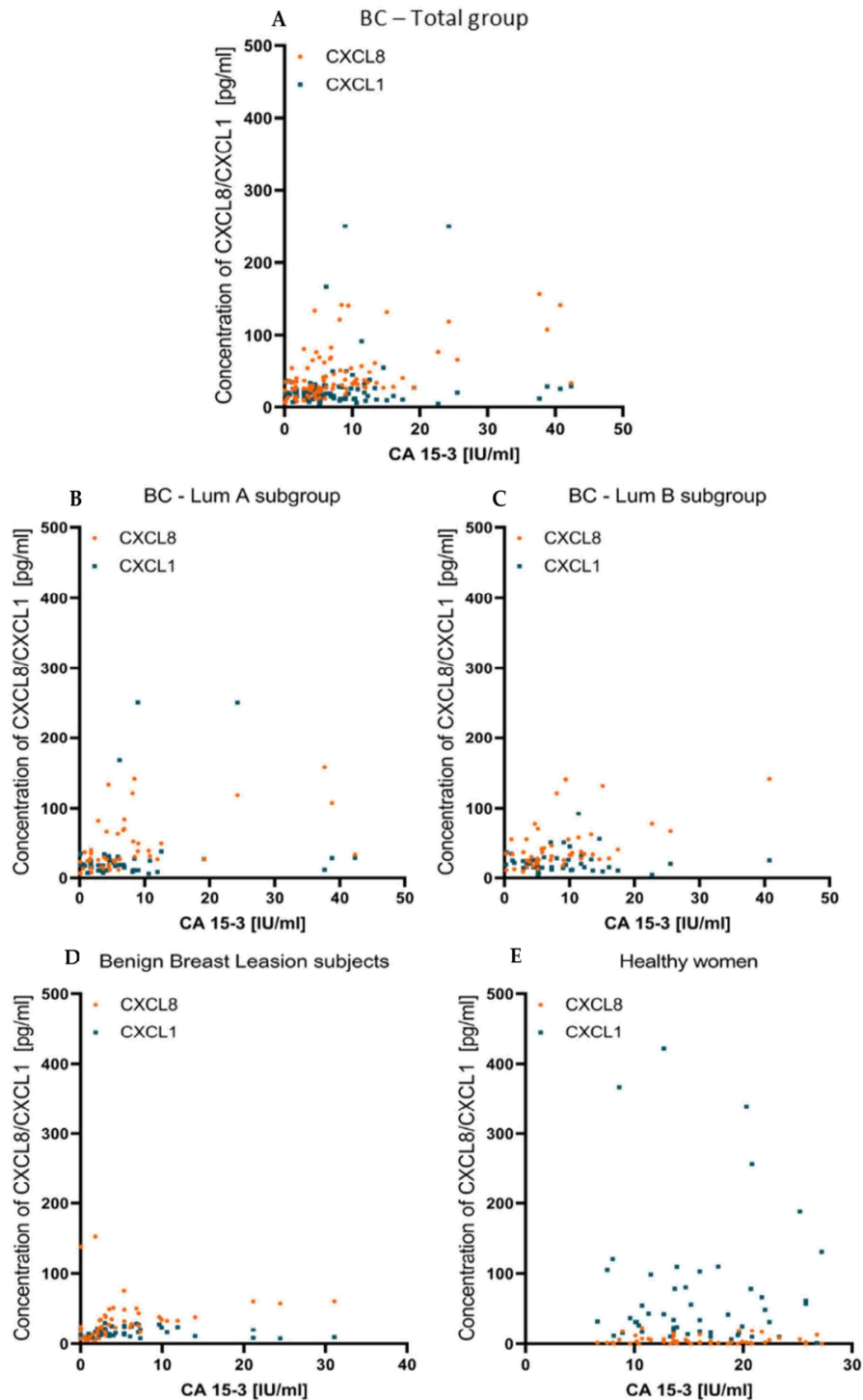


Figure 4. Correlation between preoperative level of tested chemokines and CA15-3, presented in the form of scatterplots in BC- total group (A), BC—Lum A subgroup (B), BC—Lum B subgroup (C), subjects with benign lesion (D) and healthy women (E).

However, we found significant correlations between CXCL1 and CXCL8 in the BC—total group ($r = 0.5103$, $p < 0.001$), both BC luminal subgroups—luminal A ($r = 0.5701$, $p < 0.001$) and luminal B ($r = 0.4489$, $p = 0.001$) and in the group of subjects with benign lesion ($r = 0.5311$, $p < 0.001$) (Figure 5).

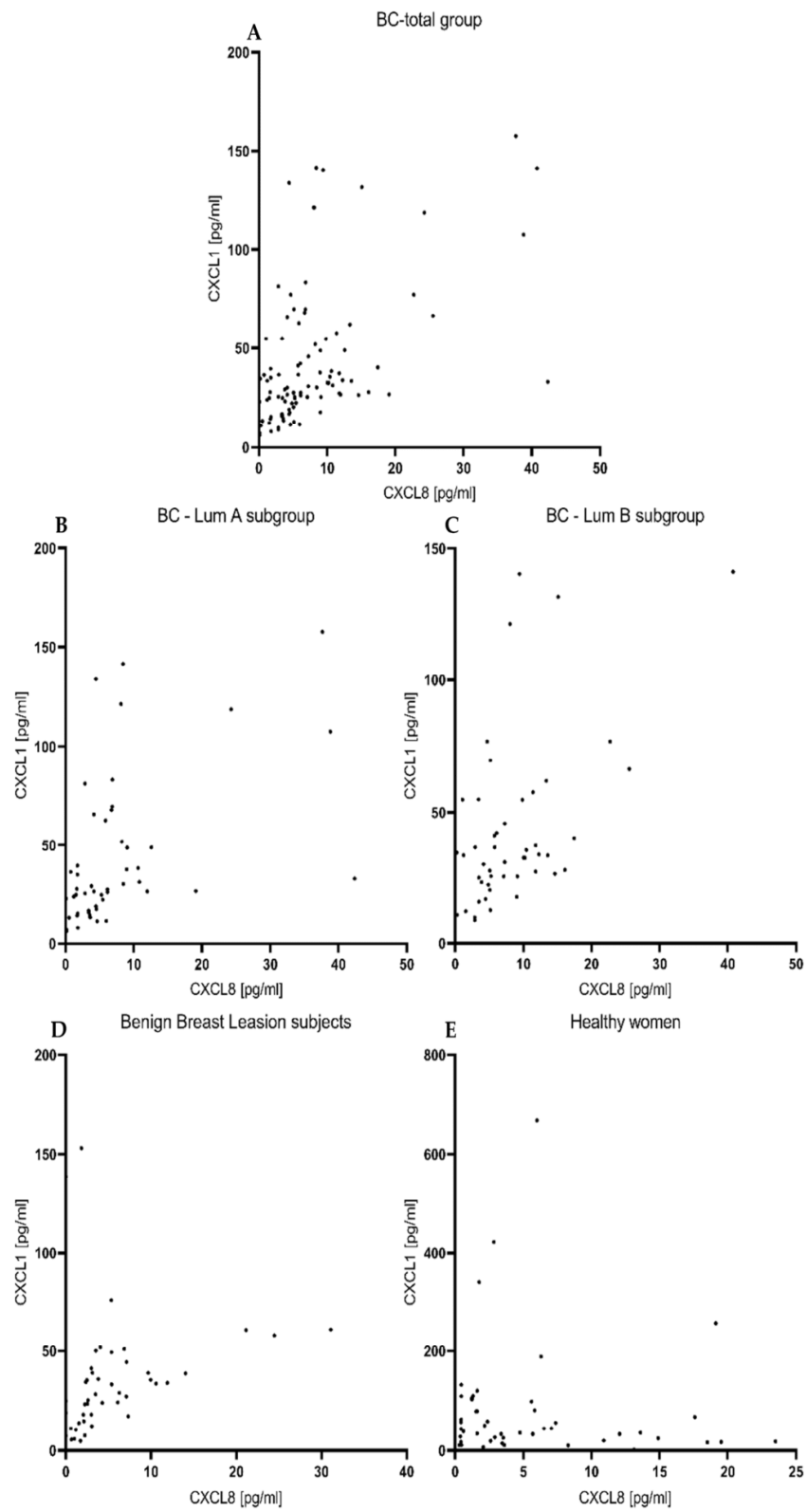


Figure 5. Correlation between CXCL1 and CXCL8, presented in the form of scatterplots in BC—total group (A), BC—Lum A subgroup (B), BC—Lum B subgroup (C), subjects with benign lesion (D) and healthy women (E).

3.3. Postoperative Concentrations

Our team was able to evaluate pre- and post-operation levels of the studied parameters among 43 of our patients (Table 2). At 4–6 weeks after the surgical treatment, a statistically significant decrease was observed, only for CA 15-3 (preoperative 18.2 IU/mL, postoperative 17.8 IU/mL, $p = 0.029$), when analyzing the whole pre-to-post-operative group. Statistical analysis performed on luminal A and luminal B subgroups no longer showed a significant reduction in CA 15-3 concentrations. Among patients of luminal A subtype of BC, statistical analysis also showed a significant increase in the concentrations of both chemokines tested in the postoperative period compared to the preoperative phase—CXCL1 increased from 30.832 pg/mL to 41.414 pg/mL ($p = 0.048$), while CXCL8 increased from 5.326 pg/mL to 7.229 pg/mL ($p = 0.023$). However, we did not show this relationship for either the subgroup of patients with luminal B BC or the entire study group.

Table 2. Plasma levels of tested parameters prior to and post to surgical treatment of breast cancer patients.

	CXCL1 [pg/mL] Median (Q1–Q3)	CXCL8 [pg/mL] Median (Q1–Q3)	CA 15-3 [IU/mL] Median (Q1–Q3)
BC—total group (n = 43)			
Before surgery	32.606 (25.963–54.763)	7.261 (3.807–11.115)	18.2 (13.95–26.9)
After surgery (4–6 weeks)	40.254 (31.305–55.098)	7.313 (3.853–12.556)	17.8 (12.9–20.0)
<i>p</i>	0.059	0.443	0.029
BC—Luminal A subgroup (n = 22)			
Before surgery	30.832(20.236–46.467)	5.326 (1.77–8.846)	18.25 (13.675–28.125)
After surgery (4–6 weeks)	41.414 (32.966–52.634)	7.229 (4.729–11.593)	18.100 (13.975–19.3)
<i>p</i>	0.048	0.023	0.153
BC—Luminal B subgroup (n = 21)			
Before surgery	33.868 (27.363–57.562)	10.043 (5.153–12.286)	18.2 (14.6–25.9)
After surgery (4–6 weeks)	37.061 (29.965–81.177)	7.508 (2.73–12.579)	15.6 (12.4–20.1)
<i>p</i>	0.532	0.509	0.063

In addition, we conducted a comparison between concentrations of studied parameters in patients after surgery against subjects with benign lesion and healthy women. In the total group of BC patients, CXCL8 remained at a higher level than for healthy women ($p < 0.001$) and subjects with benign lesion ($p = 0.003$). Additionally, for the luminal A and luminal B cancer patient subgroups, we showed significantly higher levels than for healthy women (luminal A $p = 0.001$; luminal B $p = 0.011$) and subjects with benign lesion (luminal A $p = 0.006$; luminal B $p = 0.044$). For CXCL1, we noticed significantly higher postoperative concentrations in the total BC group of patients only, compared to subjects with benign lesion ($p = 0.005$). Analyzing luminal A and B subgroups for CXCL1, we noticed adequately higher postoperative concentrations only, compared to subjects with benign lesion (luminal A $p = 0.012$; luminal B $p = 0.042$). By contrast, we did not observe significant differences in postoperative CA15-3 concentrations relative to the group of healthy women or subjects with benign lesion.

3.4. Diagnostic Criteria of CXCL1 and CXCL8—Pre- and Post-Menopausal Subjects

Table 3 contains the diagnostic criteria—SE, SP, PPV and NPV in BC patients.

Table 3. Diagnostic criteria of tested parameters in patients with BC: total group and luminal A and B subgroups.

Tested Parameter	Diagnostic Criterium (%)	Breast Cancer		
		Lum A Subgroup	Lum B Subgroup	Total Group
CXCL1	SE	60	54	57
	SP	54	54	54
	PPV	56.6	54	71.25
	NPV	57.45	54	38.59
CXCL8	SE	64	76	70
	SP	60	60	60
	PPV	61.54	65.52	77.78
	NPV	62.50	71.43	50
CA 15-3	SE	54	56	55
	SP	64	64	64
	PPV	60	60.87	75.34
	NPV	58.18	59.26	41.56
CXCL1 + CA 15-3	SE	84	76	80
	SP	34	34	34
	PPV	56	53.52	70.8
	NPV	68	58.62	45.95
CXCL8 + CA 15-3	SE	80	94	88
	SP	38	38	38
	PPV	56.34	60.26	73.95
	NPV	65.52	86.36	61.29
CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3	SE	98	94	96
	SP	18	18	18
	PPV	54.45	53.41	70.07
	NPV	90	75	69.23

SE—diagnostic sensitivity; SP—diagnostic specificity; PPV—positive predictive value; NPV—negative predictive value

The highest SE for the BC total patient group was achieved by CXCL8 (70%). The other parameters, CXCL1 and CA 15-3, had SE at similar levels (57%, 55%, respectively). All parameters reached fairly close SP values, with the highest value being reached for the comparative marker (CA 15-3—64%, CXCL8—60%, CXCL1—54%). An analysis of combined parameters increased SE of the tests for CXCL1 + CA 15-3 by up to 80%, and for CXCL8 + CA 15-3 by up to 88%, reaching the highest value for the combination of all tested factors—CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3 up to 96%. When performing an analysis of combined parameters, we observed a decrease in SP.

Analyzing the individual subgroups, we noticed the similarity between the obtained SE results and the total group of patients. In both the Luminal A and Luminal B BC patient subgroups, the highest SE value for a single parameter was shown by CXCL8 (64%, 76%, respectively). In the Luminal A BC patient subgroup, the lowest SE value was recorded for CA 15-3 (54%), while, for the Luminal B BC patient subgroup, this was observed for CXCL1 (54%). When analyzing the combined parameters, the SE increased in both subgroups. In the Luminal A BC patient subgroup, the highest SE was shown by the combined of the three parameters CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3 (98%), while in the Luminal B BC patient subgroup—for two combinations with equal values of 94%—CXCL8 + CA 15-3 and CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3.

When examined as a total group of patients, CXCL8 was the only one of the tested chemokines to show a higher PPV (77.78%) and NPV (50%) than the comparative marker CA 15-3 (75.34%, 41.56%, respectively). Both features were the lowest for CXCL1 (71.25%, 38.59%, respectively). Analyzing the parameter combinations, we noticed an increase in NPV, with a relatively small decrease in PPV, reaching the following values for each

combination: CXCL1 + CA 15-3—NPV 45.95%, PPV 70.8%, CXCL8 + CA 15-3—NPV 61.29%, PPV 73.95%, CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3—NPV 69.23%, PPV 70.07%. The highest PPV, as a combined parameter, was achieved by the CXCL8 + CA 15-3 set (73.95%), while the highest NPV was achieved by CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3 set (69.23%).

Looking at the subgroup of Luminal A BC patients, we recorded the highest PPV for CXCL8 (61.54%) as an individual parameter and the combination of two parameters CXCL8 + CA 15-3 (56.34%). Additionally, as a single parameter, CXCL8 had the highest NPV (62.5%). For the combined markers, the highest NPV was shown by the combination of all three compounds, CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3 (90%), at the same time, with the lowest PPV of the combined sets (54.45%). In the Luminal B BC patient subgroup, CXCL8 also showed the highest PPV (65.52%) and NPV values (71.43%) for single markers. In the combined parameter analysis, the CXCL8 + CA 15-3 set demonstrated the highest NPV, with values of 86.36%.

The ROC is a curve illustrating the dependence of SE on SP for the studied parameters, while the potential clinical utility as a tumor-marker will be demonstrated by the AUC, while also determining its diagnostic power. An AUC value of 0.5 is a borderline of the diagnostic usefulness of the test. The detailed parameters of the ROC curve analysis are shown in Table 4. In the total BC group, the AUC values for CXCL8 and CA 15-3 were significantly higher compared with AUC = 0.5 ($p = 0.005$, $p = 0.010$, respectively). The AUC for CXCL8 (0.6410) in the total BC group was higher than for CXCL1 (0.5496) and CA 15-3 (0.6300). Using a combination of CXCL1 or CXCL8 with CA 15-3 resulted in an increased AUC (0.6724, $p = 0.001$; 0.6582, $p = 0.002$, respectively). When using a combination of all tested compounds, we achieved the highest AUC of 0.7024 ($p < 0.001$) (Figure 6.).

Table 4. Characteristics of ROC curve for tested parameters in patients with BC: total group and luminal A and B subgroups.

Tested Parameter	AUC	SE (AUC)	95% C.I.	<i>p</i> (AUC = 0.5)	Comparison to CA 15-3 (<i>p</i>)
Breast cancer—total group					
CXCL1	0.5496	0.055	0.443–0.657	0.322	0.258
CXCL8	0.6410	0.052	0.539–0.742	0.005	0.874
CA 15-3	0.6300	0.045	0.541–0.719	0.010	-
CXCL1 + CA 15-3	0.6724	0.045	0.584–0.760	0.001	0.008
CXCL8 + CA 15-3	0.6582	0.046	0.568–0.749	0.002	0.066
CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3	0.7024	0.046	0.612–0.793	<0.001	0.002
Breast cancer—Luminal A subgroup					
CXCL1	0.5568	0.059	0.412–0.672	0.334	0.516
CXCL8	0.6120	0.058	0.499–0.725	0.052	0.994
CA 15-3	0.6114	0.058	0.498–0.725	0.054	-
CXCL1 + CA 15-3	0.6648	0.054	0.559–0.771	0.005	0.028
CXCL8 + CA 15-3	0.6108	0.057	0.500–0.722	0.051	0.317
CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3	0.6708	0.054	0.565–0.776	0.002	0.041
Breast cancer—Luminal B subgroup					
CXCL1	0.5424	0.060	0.425–0.660	0.478	0.185
CXCL8	0.6700	0.060	0.560–0.780	0.002	0.796
CA 15-3	0.6486	0.055	0.540–0.757	0.007	-
CXCL1 + CA 15-3	0.6800	0.053	0.576–0.784	<0.001	0.025
CXCL8 + CA 15-3	0.7056	0.052	0.604–0.807	<0.001	0.036
CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3	0.7340	0.050	0.637–0.831	<0.001	0.006

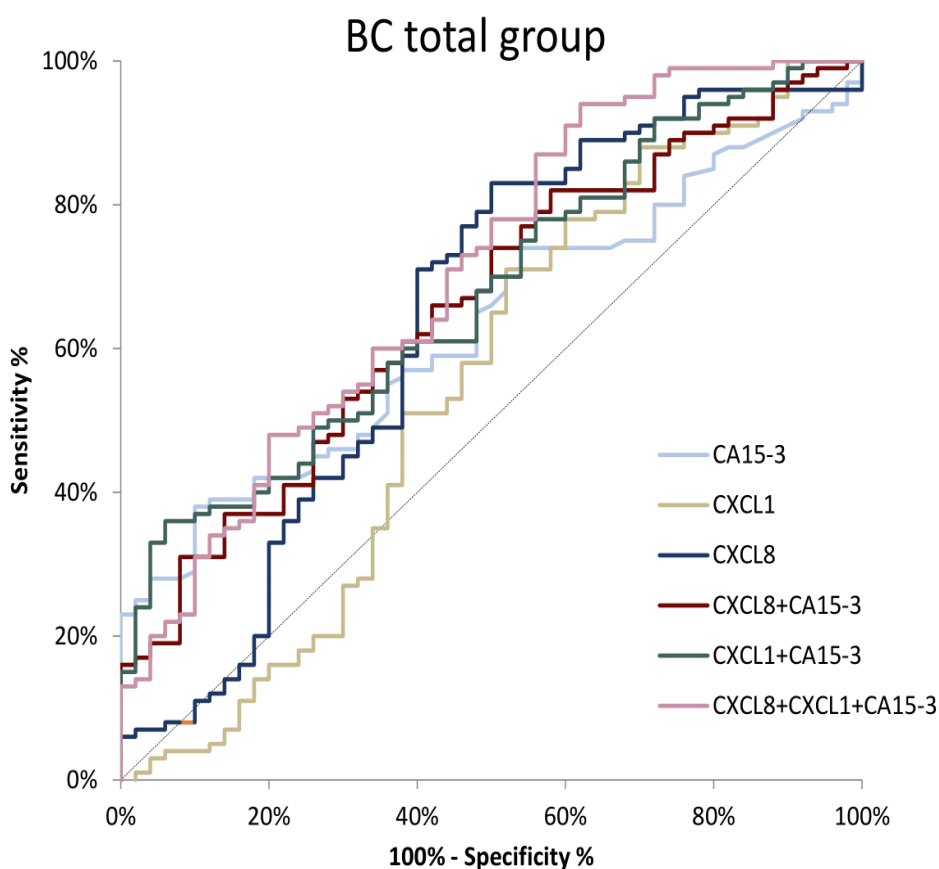


Figure 6. ROC curve for tested parameters in BC total group.

There was no single tested parameter that showed statistically significant diagnostic power ($p > 0.05$) in the BC luminal A subgroup of patients. However, the highest AUC values were observed for CXCL8 and CA 15-3 (0.6120, $p = 0.052$; 0.6114, $p = 0.054$, respectively). Among the combined parameters, the combination of both chemokines with comparative marker achieved the highest AUC value (0.6708, $p = 0.002$) (Figure 7).

In the subgroup of luminal B BC patients, we observed the highest AUC once again for a combination of all tested parameters (0.7340, $p < 0.001$). Regarding the single analysis of the studied parameters, CXCL8 again showed the highest AUC (0.6700, $p = 0.002$), which exceeded the AUC values obtained for CA 15-3 and CXCL1 (0.6486, $p = 0.007$; 0.5424, $p = 0.478$, respectively). For CXCL1, the AUC values were not significantly higher compared to AUC = 0.5 (Figure 8).

A comparison of parameter combinations against the comparative marker CA 15-3 revealed that, in the total study group and the luminal A subgroup of BC, combining CA 15-3 with CXCL1 ($p = 0.008$) and CA15-3 with CXCL1 and CXCL8 ($p = 0.002$) significantly improved the quality of the test. In the luminal B subgroup, all combinations significantly improved the quality of the test (see Table 4).

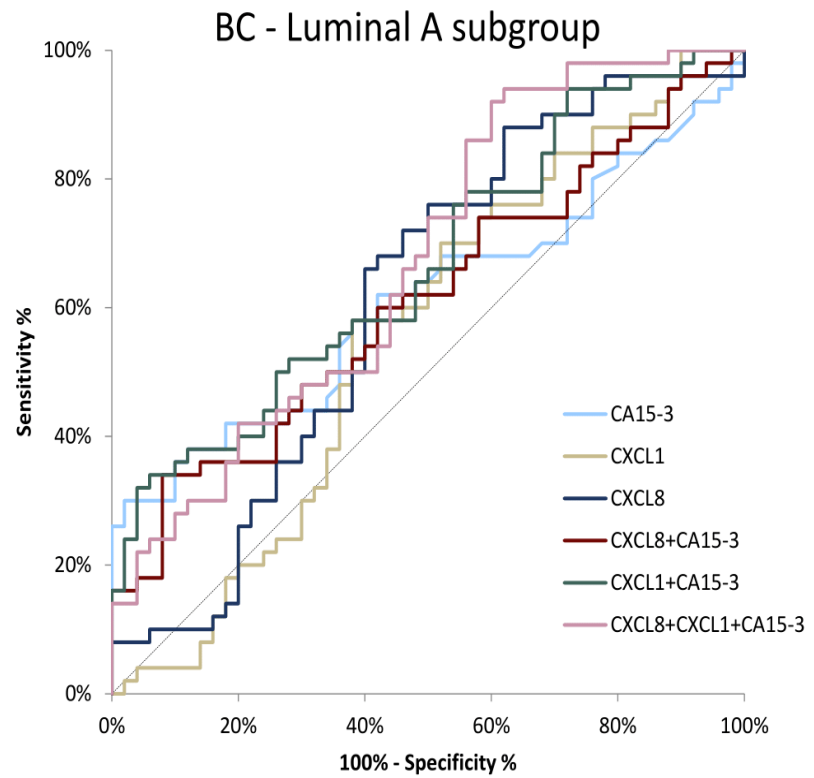


Figure 7. ROC curve for tested parameters in BC luminal A subgroup.

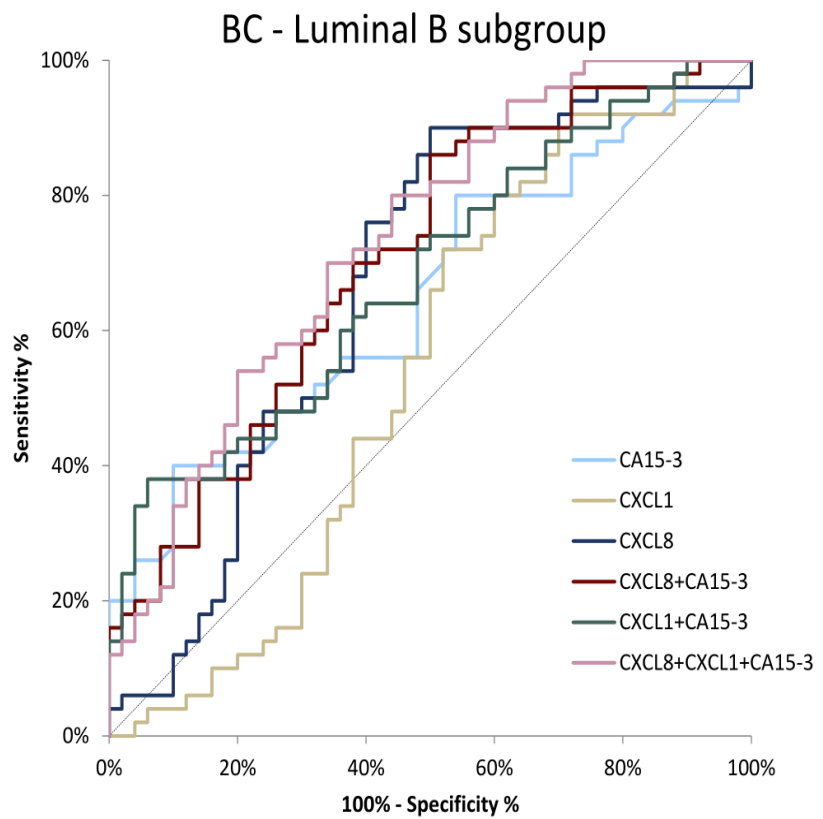


Figure 8. ROC curve for tested parameters in BC luminal B subgroup.

3.5. Diagnostic Criteria of CXCL1 and CXCL8—Postmenopausal Subjects

Table 5 shows the diagnostic criteria of tested parameters, comparative marker and analyzed combinations of parameters calculated for the postmenopausal subjects of our study.

Table 5. Diagnostic criteria of tested parameters in postmenopausal patients with BC: total group and luminal A and B subgroups.

Tested Parameter	Diagnostic Criterium (%)	Breast Cancer		
		Lum A Subgroup	Lum B Subgroup	Total Group
CXCL1	SE	44.19	42.55	43.33
	SP	42.50	42.50	42.50
	PPV	45.24	51.16	62.90
	NPV	41.46	38.64	25.00
CXCL8	SE	65.12	74.47	68.89
	SP	65.00	65.00	65.00
	PPV	66.67	71.43	81.58
	NPV	63.41	68.42	48.15
CA 15-3	SE	51.16	57.45	54.44
	SP	65.00	65.00	65.00
	PPV	61.11	65.85	77.78
	NPV	55.32	56.52	38.81
CXCL1 + CA 15-3	SE	69.77	78.72	74.44
	SP	27.50	27.50	27.50
	PPV	50.85	56.06	69.79
	NPV	45.83	52.38	32.35
CXCL8 + CA 15-3	SE	76.74	93.62	85.56
	SP	37.50	37.50	37.50
	PPV	56.90	63.77	75.49
	NPV	60.00	82.35	53.57
CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3	SE	76.74	100.00	88.89
	SP	17.50	17.50	17.50
	PPV	50.00	58.75	70.80
	NPV	41.18	100.00	41.18

SE—diagnostic sensitivity; SP—diagnostic specificity; PPV—positive predictive value; NPV—negative predictive value

In a single-parameter analysis, CXCL8 showed the highest values for SE (68.89%), SP (65%), PPV (81.58%) and NPV (48.15%). The comparative marker CA 15-3 achieved identical sensitivity to CXCL8, while achieving lower values for the other diagnostic features—SE (54.44%), PPV (77.78%), NPV (38.81%). The lowest values of diagnostic features were demonstrated by CXCL1.

Combined parameter analysis increased the sensitivity of the test in each case, reaching the highest value for the combination of CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3 (88.89%). However, combining parameters into panels resulted in a corresponding decrease in the SP value of the assay. Of the combined panels, the CXCL8 + CA 15-3 combination achieved the highest SP (37.5%), PPV (75.49%) and NPV (53.57%). The NPV for this combination also increased above the values achieved for all individual parameters.

Analyzing the results in the subgroups of luminal A and B BC patients, CXCL8 again reached the highest values for all diagnostic features—in luminal A subgroup—SE 65.12%; PPV 66.67%, NPV 63.41%; in luminal B subgroup SE 74.47%, PPV 71.43%, NPV 68.42%. Worse diagnostic features than CXCL8 in both luminal subgroups were demonstrated by CA 15-3 (luminal A SE 51.16%, PPV 61.11%, NPV 55.32%; luminal B SE 57.45%, PPV 65.85%, NPV 56.52%). Analogous to the results obtained for the whole group, CXCL1 in both luminal subgroups showed the worst values of the calculated criteria.

In luminal A cancer subgroup, the combined parameter analysis showed the highest SE (76.74%), SV (37.50%), PPV (56.9%) and NPV (60%) for the CXCL8 + CA 15-3 combination, reaching the highest SE and NPV values shown in the entire study. The three-parameter combination of CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3 had an equally high SE value as the CXCL8 + CA 15-4 combination, while lower values were obtained for the other features.

In the subgroup of patients with luminal B BC, the combined analysis increased the SE and NPV of the tests, reaching the highest value of 100% for both features for the combination of CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3. At the same time, this combination reached the lowest sensitivity recorded in the whole study (17.5%). Among the combined parameters, the CXCL8 + CA 15-3 combination showed the highest PPV (63.77%), but this value was lower than that obtained for the single parameters of both CXCL8 and CA 15-3.

The detailed parameters of the ROC curve analysis for only postmenopausal subjects of study are shown in Table 6.

Table 6. Characteristics of ROC curve for tested parameters in postmenopausal patients with BC—total group and luminal A and B subgroups.

Tested Parameter	AUC	SE (AUC)	95% C.I.	<i>p</i> (AUC = 0.5)	Comparison to CA 15-3 (<i>p</i>)
Breast cancer—total group					
CXCL1	0.5633	0.060	0.446–0.680	0.250	0.288
CXCL8	0.6961	0.054	0.591–0.801	<0.001	0.515
CA 15-3	0.6461	0.049	0.550–0.742	0.008	-
CXCL1 + CA 15-3	0.6872	0.048	0.592–0.782	<0.001	0.011
CXCL8 + CA 15-3	0.7114	0.048	0.618–0.805	<0.001	0.007
CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3	0.7464	0.048	0.652–0.841	<0.001	<0.001
Breast cancer—Luminal A subgroup					
CXCL1	0.5512	0.064	0.424–0.678	0.423	0.4631
CXCL8	0.6797	0.060	0.562–0.797	0.005	0.4813
CA 15-3	0.6195	0.062	0.497–0.742	0.061	-
CXCL1 + CA 15-3	0.6628	0.059	0.546–0.779	0.011	0.050
CXCL8 + CA 15-3	0.6471	0.060	0.529–0.766	0.021	0.079
CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3	0.6901	0.058	0.576–0.804	0.003	0.027
Breast cancer—Luminal B subgroup					
CXCL1	0.5745	0.065	0.448–0.701	0.233	0.267
CXCL8	0.7112	0.058	0.581–0.825	<0.001	0.651
CA 15-3	0.6705	0.058	0.557–0.784	0.006	-
CXCL1 + CA 15-3	0.7059	0.055	0.598–0.814	<0.001	0.029
CXCL8 + CA 15-3	0.7601	0.052	0.659–0.861	<0.001	0.003
CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3	0.7883	0.049	0.692–0.885	<0.001	0.001

In the total BC group, the AUC values for CXCL8 (0.6961) and CA 15-3 (0.6461) were significantly higher compared with AUC = 0.5 ($p < 0.001$, $p = 0.008$, respectively). The AUC for CXCL8 was the highest in the total BC group. Combining parameters into panels increased the AUC values for all parameters, reaching a peak for three-parametric combination CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3 (0.7464, $p < 0.001$). The addition of a combination of parameters into panels led to a significant enhancement in the quality of the test compared to the single CA 15-3 marker (see Table 6).

When analyzing individual subgroups of BC, CXCL8 showed the highest values of AUC of all single parameters. In the luminal A subgroup of patients, only CXCL8 showed statistically higher AUC (0.6797, $p = 0.005$) compared to the AUC borderline value. Only a combination of all three parameters CXCL1 + CXCL8 + CA 15-3 (0.6901) exceeded the AUC value demonstrated for CXCL8. In the luminal A subgroup of BC patients, looking at acquired results of single parameters, the addition of CXCL1 to combined panels significantly enhanced the quality of the test.

In the luminal B subgroup of patients CXCL8 (0.7112), as well as CA 15-3 (0.6705), statistical importance was demonstrated compared to AUC = 0.5 ($p < 0.001$, $p = 0.006$, respectively). An analysis of combined parameters increased AUC values, which reached their peak value for a tree-parametric combination of CXCL1, CXCL8 and CA 15-3 (0.7883, $p < 0.001$). In the luminal B subgroup of patients, combined panels led to a significant enhancement in the quality of the test when compared to the individual CA 15-3 parameters.

4. Discussion

Breast cancer is one of the most common malignancies among women [1]. Many inter-related factors contribute to the incidence of BC, including genetic or environmental factors and hormonal imbalances [7,8]. According to the literature reports, the presence of chronic inflammation may also predispose to BC [8]. One of the mediators of the inflammatory process are chemokines. Additionally, chemokines are also involved in numerous adverse processes associated with cancer progression and invasion [9,10]. CXCL1 and CXCL8 have multidirectional effects, which can be associated with several adverse processes related to carcinogenesis, such as cell adhesion, angiogenesis, proliferation, migration, metastasis and the induction of resistance to pharmacological anticancer treatment [11–22]. The aforementioned properties of these chemokines translate into an unfavorable prognosis for cancer patients overexpressing these proteins [27,28].

Currently, medicine places great emphasis on early cancer diagnosis, which would enable faster treatment, resulting in improved patient prognosis. In many cancer groups, introduced screening programs, such as mammography, colonoscopy or smear tests, have improved the early detection of these diseases. However, additional methods for the early detection of cancer, especially at the asymptomatic stage, are constantly being sought [29,30]. Among the proposed diagnostic methods is the determination of circulating biomarkers [29]. In this study, we focused on evaluating the diagnostic utility of two chemokines, CXCL1 and CXCL8, as novel biomarkers in Luminal A and B breast cancer, as well as in control groups, i.e., patients with benign lesions (*fibroadenoma*) and healthy volunteers, alone and in correlation with the routinely measured breast cancer marker—CA 15-3.

CXCL1 is expressed in breast cancer cells and the stroma surrounding the cancerous lesion [18,24,31], and the expression levels of this chemokine depended on the size and stage of the tumor and the abundance of metastases [18]. In addition, the overexpression of CXCL1 in the stroma was associated with faster disease recurrence and worse patient prognosis [24]. In vitro, CXCL1 stimulated the proliferation, invasion, and migration of breast cancer cells while inhibiting apoptosis, which seems to partially explain the unfavorable prognosis of patients with overexpression of this chemokine [18,32]. At present, there are no studies determining plasma CXCL1 levels in patients with breast cancer. However, according to the literature data, elevated CXCL1 levels were found in patients with ovarian cancer, among others [33]. Conflicting results apply to lung cancer patients, where no differences were found between patients with an advanced stage of disease and healthy subjects. On the other hand, patients with early-stage cancer have lower levels of CXCL1 compared to advanced forms of the disease and healthy volunteers. However, it should be noted that the study was conducted on a small number of patients ($n = 30$, for each group) [34]. According to our results, there are no differences in plasma CXCL1 levels between patients with BC, benign lesions, and healthy women. However, it should be noted that breast cancer cells produce CXCL1 [31], but it is not known whether CXCL1 concentrations are high enough to exceed the detection threshold when determined by a given analytical method from peripheral blood samples. The results we obtained for CXCL1 are puzzling, as the concentrations by themselves showed no differences between the study groups; however, when analyzing diagnostic features, the inclusion of CXCL1 in the combined analysis decreased the level of specificity and both predictive values, while increasing the sensitivity of the test and significantly improving the quality of the test, especially in the luminal A subgroup of BC, whereas, in ROC analysis, CXCL8 showed no such effect. This relationship between the CXCL1 appeared both in the analysis of the

entire study group and in the evaluation of postmenopausal patients only. Thus, it there seems to be some relationship between this parameter and breast cancer, but, to accurately determine the impact of this chemokine in diagnosis, it is necessary to determine the CXCL1 concentrations in patients with breast pathologies and healthy women on a larger and more diverse group of patients.

Similar to CXCL1, CXCL8 expression was demonstrated in BC tumor samples where mRNA levels were independent of tumor size and stage, metastatic abundance, and chemotherapy efficacy. In estrogen receptor-negative patients, high CXCL8 expression was associated with a worse prognosis for patients [25]. Consistent with our results, BC patients (of total BC group and luminal B subtype of BC group) had statistically higher serum CXCL8 levels than patients with benign lesions and healthy women. This agrees with the results obtained by Narita et al. [35]. Higher levels of CXCL8 in BC patients were also found by Benoy et al. [36], Celik et al. [37] and Ma et al. [32], but it should be noted that the analyses were performed in serum, not in plasma, as in our study. Additionally, according to Benoy et al. [36] and Ma et al. [32], CXCL8 concentrations correlated with cancer stage and the presence of metastatic foci. In our study, we did not perform an analysis of the relationship between CXCL8 concentrations and cancer stage and the presence of metastases. Unfortunately, in the present study, we did not analyze the dependence of CXCL8 levels on the stage of cancer and the presence of metastases; however, in future studies, we plan to perform an equal analysis in the plasma obtained from BC patients.

CA 15-3 is a marker that is routinely performed for the diagnosis of BC [4,38–40]. According to our results, CA 15-3 levels were higher in BC patients compared to the control and comparison groups. This agrees with previous studies conducted by our group [38,40]. It is notable that the pattern in statistical differences in CXCL8 concentrations in the study groups was identical to that shown by the comparative marker CA 15-3.

In our study, postoperative CXCL1 and CXCL8 concentrations in BC patients did not change significantly 4–6 weeks after surgical treatment. The rise in the luminal A subgroup of BC was most probably a response to the healing process of the surgical wound, especially since baseline concentrations in this receptor subtype were slightly lower than among patients with luminal subtype B of BC. To our knowledge, there are no studies on postoperative plasma CXCL8 concentrations in BC patients and CXCL1 in oncology patients. Wang et al. [41] evaluated the serum levels of CXCL8 before and after surgical treatment of patients with triple-negative BC and noted no change in its levels. However, we are unable to relate these results to those obtained by our team, since the paper does not take into account the postoperative cytokine-storm phase, which excludes CXCL8 testing immediately after surgical treatment [41]. However, according to Kumara et al. [42], in patients with colon cancer, high levels of CXCL8 persisted for 4 weeks, which partially agrees with the results we obtained. Within 4–6 weeks after surgery, we observed a decrease in CA 15-3 concentration, which agrees with the experience of Będkowska et al. [39].

In our study, we performed SE, SP, PPV and NPV assays to determine the diagnostic utility of the tested markers. The SE values for CXCL8 were higher than the SE determined for the routine marker CA 15-3. To the best of our knowledge, we are the first group to determine the diagnostic utility of CXCL1 and CXCL8 in BC and are, therefore, unable to relate our results to the work of other authors. However, it is worth noting that Pawluczuk et al. [43], in patients with gastric cancer, also obtained a higher SE value for CXCL8 compared to routinely determined marker CEA, although this was comparable to the SE for CA 19-9. In our study, we obtained a higher SP value for the routine marker CA 15-3 than for CXCL1 and CXCL8; still, all values were relatively close to each other. Interestingly, analyses performed in gastric cancer patients showed that CXCL8 has higher SP values than the routine marker (CA 19-9) [43].

The PPV and NPV values we obtained for CXCL8 were higher than those obtained for CA 15-3. When performing a combined analysis of tested parameters, NPV values increased, obtaining better numbers than for individual compounds. Pawluczuk et al. [43] had the same outcome in patients with gastric cancer, where the PPV and NPV determined

for CXCL8 was higher than for the routine marker CA 19-9. Additionally, similarly to our data, performing a combined analysis increased NPV. It is unfortunate that no data exist on the diagnostic criteria of serum/plasma level of CXCL1 in oncology patients with breast cancer or other types of cancer [43].

The highest values of diagnostic power were observed for CXCL8, both in the total study group and in luminal subtype B of breast cancer. Additionally, values increased when analyzed together with CA 15-3. It should be noted that these results are novel and have not yet been evaluated by other authors worldwide regarding breast cancer. Team Pawluczuk et al. also evaluated the diagnostic significance of CXCL8 as a marker of gastric cancer. In analogy to our results, the AUC values of CXCL8 were superior to those obtained for classical tumor markers (for BC—CA 15-3, for gastric cancer—CEA and CA 19.9). In addition, we also noted the same pattern of improvement in AUC values by analyzing combined parameter panel (CXCL8 and CRP) [43].

Investigating circulating chemokines in the bloodstream is a new branch of our research cycle on diagnostic markers for breast cancer [38–40,44,45]. In light of our results, CXCL8 appears to provide the most improvements in the diagnostic process of breast cancer as a single parameter, as well as when combined with CA 15-3, but our study needs to be expanded. The group of patients we studied did not include patients with HER2-positive or triple-negative breast cancer, which are important subgroups because of its malignancy and difficulty in treating. Despite the fact that, in our study, the menopausal status of the patients did not have a major effect on the obtained results, this effect may also be influenced by the size of the study groups. Therefore, we do not exclude the possibility that, in a study of larger groups of patients, menopausal status may prove to be an important factor influencing the results. When performing our analysis, we based the statistics on tests that take into account the lack of normal distribution of the data. We observed a clear skewness towards higher concentrations. We also did not correct for outliers so as not to artificially modify the obtained results, especially since our groups consisted of only 100 patients and not, for example, 1000. Therefore, we know that there may be a possibility that our results will change if a greater number of patients and more types of breast cancer are analyzed. Nevertheless, we are the first group, to our knowledge, to analyze the diagnostic utility of CXCL1 and CXCL8 in breast cancer, in combination with CA 15-3, and we hope that our research will inspire other researchers and prove to be useful in the diagnostic process in the future.

Author Contributions: Conceptualization, S.L. and J.M.; methodology, J.M.; software, S.L. and J.M.; validation, S.L., E.G. and J.M.; formal analysis, J.M.; investigation, J.M., M.K. and A.K.; resources, S.L., J.M., A.K. and M.K.; data curation, S.L. and E.G.; writing—original draft preparation, J.M.; writing—review and editing, J.M., S.L., A.K., M.K., P.L. and E.G.; visualization, J.M. and P.L.; supervision, S.L. and E.G.; project administration, S.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by statutory grants (SUB/1/DN/22/006/1201; SUB/1/DN/22/002/1201) of the Medical University of Białystok.

Institutional Review Board Statement: This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was authorized by the local Ethical Committee of the Medical University of Białystok (committee approval numbers: R-I-002/239/2014 (approval date 2014.05.29), R-I-002/51/2015 (approval date 2015.02.26), APK.002.104.2021 (approval date 2021.05.25).

Informed Consent Statement: All subjects granted their written and informed consent prior to participation in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Azamjah, N.; Soltan-Zadeh, Y.; Zayeri, F. Global Trend of Breast Cancer Mortality Rate: A 25-Year Study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2019**, *20*, 2015–2020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Swedish Organised Service Screening Evaluation Group. Reduction in breast cancer mortality from the organised service screening with mammography: 2. Validation with alternative analytic methods. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2006**, *15*, 52–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Duffy, M.J.; Evoy, D.; McDermott, E.W. CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411*, 1869–1874. [[CrossRef](#)]
- Jafari, S.H.; Saadatpour, Z.; Salmaninejad, A.; Momeni, F.; Mokhtari, M.; Nahand, J.S.; Rahmati, M.; Mirzaei, H.; Kianmehr, M. Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 5200–5213. [[CrossRef](#)]
- Barzaman, K.; Karami, J.; Zarei, Z.; Hosseinzadeh, A.; Kazemi, M.H.; Moradi-Kalbolandi, S.; Safari, E.; Farahmand, L. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *84*, 106535. [[CrossRef](#)]
- Houghton, S.C.; Hankinson, S.E. Cancer Progress and Priorities: Breast Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2021**, *30*, 822–844. [[CrossRef](#)]
- Shacter, E.; Weitzman, S.A. Chronic inflammation and cancer. *Oncology* **2002**, *16*, 217–226, 229; discussion 230–232.
- Liu, H.; Yang, Z.; Lu, W.; Chen, Z.; Chen, L.; Han, S.; Wu, X.; Cai, T.; Cai, Y. Chemokines and chemokine receptors: A new strategy for breast cancer therapy. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 3786–3799. [[CrossRef](#)]
- Bikfalvi, A.; Billotet, C. The CC and CXC chemokines: Major regulators of tumor progression and the tumor microenvironment. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2020**, *318*, C542–C554. [[CrossRef](#)]
- Acharyya, S.; Oskarsson, T.; Vanharanta, S.; Malladi, S.; Kim, J.; Morris, P.G.; Manova-Todorova, K.; Leversha, M.; Hogg, N.; Seshan, V.E.; et al. CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* **2012**, *150*, 165–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Miyake, M.; Hori, S.; Morizawa, Y.; Tatsumi, Y.; Nakai, Y.; Anai, S.; Torimoto, K.; Aoki, K.; Tanaka, N.; Shimada, K.; et al. CXCL1-mediated interaction of cancer cells with tumor-associated macrophages and cancer-associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. *Neoplasia* **2016**, *18*, 636–646, Erratum in: *Neoplasia* **2017**, *19*, 250–251. [[CrossRef](#)]
- Xu, J.; Zhang, C.; He, Y.; Wu, H.; Wang, Z.; Song, W.; Li, W.; He, W.; Cai, S.; Zhan, W. Lymphatic endothelial cell-secreted CXCL1 stimulates lymphangiogenesis and metastasis of gastric cancer. *Int. J. Cancer.* **2012**, *130*, 787–797. [[CrossRef](#)]
- Wang, Z.; Wang, Z.; Li, G.; Wu, H.; Sun, K.; Chen, J.; Feng, Y.; Chen, C.; Cai, S.; Xu, J.; et al. CXCL1 from tumor-associated lymphatic endothelial cells drives gastric cancer cell into lymphatic system via activating integrin β 1/FAK/AKT signaling. *Cancer Lett.* **2017**, *385*, 28–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kuo, P.L.; Shen, K.H.; Hung, S.H.; Hsu, Y.L. CXCL1/GRO α increases cell migration and invasion of prostate cancer by decreasing fibulin-1 expression through NF- κ B/HDAC1 epigenetic regulation. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 2477–2487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Han, K.Q.; He, X.Q.; Ma, M.Y.; Guo, X.D.; Zhang, X.M.; Chen, J.; Han, H.; Zhang, W.W.; Zhu, Q.G.; Zhao, W.Z. Targeted silencing of CXCL1 by siRNA inhibits tumor growth and apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2015**, *47*, 2131–2140. [[CrossRef](#)]
- Wang, L.; Zhang, C.; Xu, J.; Wu, H.; Peng, J.; Cai, S.; He, Y. CXCL1 gene silencing inhibits HGC803 cell migration and invasion and acts as an independent prognostic factor for poor survival in gastric cancer. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 4673–4679. [[CrossRef](#)]
- Ma, K.; Yang, L.; Shen, R.; Kong, B.; Chen, W.; Liang, J.; Tang, G.; Zhang, B. Th17 cells regulate the production of CXCL1 in breast cancer. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *56*, 320–329. [[CrossRef](#)]
- Wang, Y.; Liu, J.; Jiang, Q.; Deng, J.; Xu, F.; Chen, X.; Cheng, F.; Zhang, Y.; Yao, Y.; Xia, Z.; et al. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Secreted CXCL1 and CXCL8 Facilitate Breast Tumor Growth By Promoting Angiogenesis. *Stem Cells* **2017**, *35*, 2060–2070. [[CrossRef](#)]
- Mishra, A.; Suman, K.H.; Nair, N.; Majeed, J.; Tripathi, V. An updated review on the role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in the progression and metastasis of breast cancer. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 6551–6561. [[CrossRef](#)]
- Al-Khalaf, H.H.; Al-Harbi, B.; Al-Sayed, A.; Arafah, M.; Tulbah, A.; Jarman, A.; Al-Mohanna, F.; Aboussekhra, A. Interleukin-8 Activates Breast Cancer-Associated Adipocytes and Promotes Their Angiogenesis- and Tumorigenesis-Promoting Effects. *Mol. Cell Biol.* **2019**, *39*, e00332-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Singh, J.K.; Simões, B.M.; Howell, S.J.; Farnie, G.; Clarke, R.B. Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, 210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Divella, R.; Daniele, A.; Savino, E.; Palma, F.; Bellizzi, A.; Giotta, F.; Simone, G.; Lioce, M.; Quaranta, M.; Paradiso, A.; et al. Circulating levels of transforming growth factor- β (TGF- β) and chemokine (C-X-C motif) ligand-1 (CXCL1) as predictors of distant seeding of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 1491–1497. [[PubMed](#)]
- Zou, A.; Lambert, D.; Yeh, H.; Yasukawa, K.; Behbod, F.; Fan, F.; Cheng, N. Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF- β signaling proteins. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Fang, Q.I.; Wang, X.; Luo, G.; Yu, M.; Zhang, X.; Xu, N. Increased CXCL8 Expression Is Negatively Correlated with the Overall Survival of Patients with ER-Negative Breast Cancer. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 4845–4852. [[CrossRef](#)]
26. Chavey, C.; Bibeau, F.; Gourgou-Bourgade, S.; Burlinon, S.; Boissière, F.; Laune, D.; Roques, S.; Lazenec, G. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.* **2007**, *9*, R15. [[CrossRef](#)]
27. Yu, S.; Yi, M.; Xu, L.; Qin, S.; Li, A.; Wu, K. CXCL1 as an Unfavorable Prognosis Factor Negatively Regulated by DACH1 in Non-small Cell Lung Cancer. *Front. Oncol.* **2020**, *9*, 1515. [[CrossRef](#)]
28. Cao, Z.; Fu, B.; Deng, B.; Zeng, Y.; Wan, X.; Qu, L. Overexpression of Chemokine (C-X-C) ligand 1 (CXCL1) associated with tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int.* **2014**, *14*, 86. [[CrossRef](#)]
29. Lokshin, A.; Bast, R.C.; Rodland, K. Circulating Cancer Biomarkers. *Cancers* **2021**, *13*, 802. [[CrossRef](#)]
30. Hunter, B.; Hindocha, S.; Lee, R.W. The Role of Artificial Intelligence in Early Cancer Diagnosis. *Cancers* **2022**, *14*, 1524. [[CrossRef](#)]
31. Yang, C.; Yu, H.; Chen, R.; Tao, K.; Jian, L.; Peng, M.; Li, X.; Liu, M.; Liu, S. CXCL1 stimulates migration and invasion in ER negative breast cancer cells via activation of the ERK/MMP2/9 signaling axis. *Int J. Oncol.* **2019**, *55*, 684–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ma, Y.; Ren, Y.; Dai, Z.J.; Wu, C.J.; Ji, Y.H.; Xu, J. IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2017**, *26*, 421–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bolitho, C.; Hahn, M.A.; Baxter, R.C.; Marsh, D.J. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocr. Relat. Cancer* **2010**, *17*, 929–940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Spaks, A.; Jaunalksne, I.; Spaka, I.; Chudasama, D.; Pirtnieks, A.; Krievins, D. Diagnostic Value of Circulating CXC Chemokines in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 6979–6983.
35. Narita, D.; Seclaman, E.; Anghel, A.; Ilina, R.; Cireap, N.; Negru, S.; Sirbu, I.O.; Ursoniu, S.; Marian, C. Altered levels of plasma chemokines in breast cancer and their association with clinical and pathological characteristics. *Neoplasma* **2016**, *63*, 141–149. [[CrossRef](#)]
36. Benoy, I.H.; Salgado, R.; Van Dam, P.; Geboers, K.; Van Marck, E.; Scharpé, S.; Vermeulen, P.B.; Dirix, L.Y. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res.* **2004**, *10*, 7157–7162. [[CrossRef](#)]
37. Celik, B.; Yalcin, A.D.; Genc, G.E.; Bulut, T.; KulogluGenc, S.; Gumuslu, S. CXCL8, IL-1 β and sCD200 are pro-inflammatory cytokines and their levels increase in the circulation of breast carcinoma patients. *Biomed. Rep.* **2016**, *5*, 259–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Piskór, B.M.; Przyłipiak, A.; Dąbrowska, E.; Sidorkiewicz, I.; Niczyporuk, M.; Szmikowski, M.; Ławicki, S. Plasma Level of MMP-10 May Be a Prognostic Marker in Early Stages of Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 4122. [[CrossRef](#)]
39. Będowska, G.E.; Gacuta, E.; Zbucka-Krętowska, M.; Ławicki, P.; Szmikowski, M.; Lemancewicz, A.; Motyka, J.; Kobus, A.; Choraży, M.; Paniczko, M.; et al. Plasma Levels and Diagnostic Utility of VEGF in a Three-Year Follow-Up of Patients with Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 5452. [[CrossRef](#)]
40. Piskór, B.M.; Przyłipiak, A.; Dąbrowska, E.; Sidorkiewicz, I.; Niczyporuk, M.; Szmikowski, M.; Ławicki, S. Plasma Concentrations of Matrilysins MMP-7 and MMP-26 as Diagnostic Biomarkers in Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1436. [[CrossRef](#)]
41. Wang, R.X.; Ji, P.; Gong, Y.; Shao, Z.M.; Chen, S. Value of CXCL8-CXCR1/2 axis in neoadjuvant chemotherapy for triple-negative breast cancer patients: A retrospective pilot study. *Breast Cancer Res. Treat.* **2020**, *181*, 561–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Shantha Kumara, H.M.C.; Sutton, E.; Bellini, G.A.; Yan, X.; Cekic, V.; Gandhi, N.D.; Whelan, R.L. Plasma interleukin-8 levels are persistently elevated for 1 month after minimally invasive colorectal resection for colorectal cancer. *Mol. Clin. Oncol.* **2018**, *8*, 471–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pawluczuk, E.; Łukaszewicz-Zajac, M.; Gryko, M.; Kulczyńska-Przybik, A.; Mroczko, B. Serum CXCL8 and Its Specific Receptor (CXCR2) in Gastric Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 5186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dąbrowska, E.; Przyłipiak, A.; Zajkowska, M.; Piskór, B.M.; Sidorkiewicz, I.; Szmikowski, M.; Ławicki, S. Possible Diagnostic Application of CXCL12 and CXCR4 as Tumor Markers in Breast Cancer Patients. *Anticancer Res.* **2020**, *40*, 3221–3229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zajkowska, M.; Gacuta, E.; Kozłowska, S.; Lubowicka, E.; Głażewska, E.K.; Chrostek, L.; Szmikowski, M.; Pawłowski, P.; Zbucka-Krętowska, M.; Ławicki, S. Diagnostic power of VEGF, MMP-9 and TIMP-1 in patients with breast cancer. A multivariate statistical analysis with ROC curve. *Adv. Med. Sci.* **2019**, *64*, 1–8. [[CrossRef](#)]

Rozdział 10.
**Publikacja 3. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early
Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast
Cancer**

Autorzy: Motyka Joanna, Gacuta Ewa, Kicman Aleksandra, Kulesza Monika, Malinowski Paweł,
Ławicki Sławomir

Czasopismo: Cancer Management and Research, 2023, 15, s. 573–589.

Numer DOI: 10.2147/CMAR.S416382

IF: 3.300; **MNiSW:** 140 punktów

Dyscypliny naukowe czasopisma: inżynieria biomedyczna, biologia medyczna, nauki farmaceutyczne, nauki medyczne, nauki o zdrowiu, biotechnologia, nauki biologiczne, weterynaria

CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer

Joanna Motyka ¹, Ewa Gacuta², Aleksandra Kicman³, Monika Kulesza¹, Paweł Malinowski⁴, Sławomir Ławicki ¹

¹Department of Population Medicine and Lifestyle Diseases Prevention, Medical University of Białystok, Białystok, Poland; ²Department of Perinatology, University Clinical Hospital of Białystok, Białystok, Poland; ³Department of Aesthetic Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland; ⁴Department of Oncological Surgery, Białystok Oncology Center, Białystok, Poland

Correspondence: Joanna Motyka, Department of Population Medicine and Lifestyle Diseases Prevention, Medical University of Białystok, Jerzego Waszyngtona 15B str, Białystok, 15-269, Poland, Tel +85 686 53 71, Email joanna.motyka@sd.umb.edu.pl

Purpose: Breast cancer is the most common type of malignancy in women. Factors that increase the risk of occurrence include chronic inflammation, with chemokines as its mediators. Therefore, the purpose of the present study was to determine the diagnostic utility of CXCL12 and CXCR4 as modern tumor markers in patients with early-stage luminal A and luminal B subtype of breast cancer and also to compare the results with the routinely used marker – CA 15-3.

Patients and Methods: The study included 100 patients with early breast cancer of luminal A and B subtypes, 50 women with benign breast lesion and 50 healthy women. The levels of CXCL12 and CXCR4 concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), comparative marker CA 15-3 – by electrochemiluminescence method (ECLIA).

Results: Concentrations of CXCL12 were significantly lower, while CXCR4 and CA 15-3 – significantly higher among patients with early-stage breast cancer than healthy women. CXCL12 also showed lower concentrations among *fibroadenoma* patients in comparison to healthy women, while CXCR4 – lower concentrations among *fibroadenoma* patients than cancer group. CXCL12 showed significantly higher values of sensitivity (79%), specificity (82%), positive predictive value (89.72%), negative predictive value (80%), diagnostic accuracy (80%) and diagnostic power (AUC = 0.8196) in the whole breast cancer group compared to the CA 15-3 marker (58%; 72%; 80.56%; 46.15%, 62.67%, 0.6434, resp.). Analysis of combined parameters resulted in increased sensitivity, negative predictive value and power of the test with a slight decrease in positive predictive value and a more significant decrease in specificity, reaching the best values for the three-parameter test CXCL12+CXCR4+CA15-3 (96%; 85.71%; AUC = 0.8812; 78.69%; 48%, resp.).

Conclusion: The results indicate the preliminary usefulness of CXCL12 and CXCR4 as early biomarkers in the diagnosis of breast cancer, especially in the combined panel with CA 15-3.

Keywords: breast cancer, luminal, CXCL12, CXCR4, biomarkers, early diagnosis

Introduction

Cancer is a global, social, health and economic problem and is the second most important cause of death in the world population. The incidence of various types of cancer is steadily increasing and their occurrence is influenced by a number of interrelated factors such as genetic or environmental conditions. The COVID-19 virus pandemic in 2020 has resulted in impeded access to health care, which has translated into delays in cancer diagnosis and, as a result, increased mortality among patients admitted to oncology departments.^{1,2} In the female population, a particularly significant health problem is breast cancer (BC) which is the most common type of malignancy in women. Despite the general availability of preventive and screening examinations such as mammography or ultrasound examinations and the constant raising of public awareness of the disease, the incidence of BC is increasing.^{3,4} In 2020 alone, BC was diagnosed in more than 2 million patients and, according to estimates, this number will steadily increase.^{1,3,4} Due to the high heterogeneity of the

disease, response to treatment is variable and BC accounts for more than 685,000 deaths worldwide.⁴ BC detected at an early stage has a good prognosis; however, due to social, economic or geographic circumstances, women are often diagnosed at higher and thus more advanced stages of cancer.^{3,5} Therefore, it is expedient to search for new, accessible and minimally invasive methods to diagnose BC. Currently, high hopes are placed on the determination of tumor markers in peripheral blood. Among the commonly used markers used in the diagnosis of BC is primarily CA 15-3 and it has limited sensitivity and specificity. In addition, determination of CA 15-3 levels from peripheral blood is not sufficient to make a definite diagnosis of BC and is mainly used to monitor patients in advanced stages of the disease.^{3,6} New candidates being considered as potential BC markers include matrix metalloproteinases,⁷ cytokines⁸ and also chemokines.⁹

The pathogenesis of BC is a complex process, related to the patient's age, genetic, hormonal and environmental factors.^{3,4,10} Among the most recent factors associated with an increased risk of BC is chronic inflammation – associated with both cancer formation and progression.¹¹ This thesis is supported in part by the fact that high levels of C-reactive protein, a classic marker of inflammation, in patients with BC have been associated with a poor prognosis.¹² A number of inflammatory mediators are involved in both the induction and maintenance of inflammation, which include chemokines – small-molecule proteins belonging to the cytokine family. These molecules are responsible for a number of cellular phenomena such as migration, proliferation or chemotaxis.^{13,14} One of the more thoroughly studied chemokine is C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12) which binds to a specific receptor - C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4). The CXCL12/CXCR4 axis plays an important role in carcinogenesis where it mediates cancer cell proliferation, angiogenesis and metastatic foci formation.¹⁴ In vitro, in a BC model, activation of the CXCL12/CXCR4 axis was associated with increased migration, proliferation, invasion of cancer cells and also with induction of chemotherapy resistance and angiogenesis.^{15,16}

Currently, the preliminary diagnostic utility of CXCL12/CXCR4 axis components as blood markers has been determined in various types of cancer such as pancreatic¹⁷ and esophageal cancer.¹⁸ In addition, there are also the first reports on the possibility of using CXCL12 and CXCR4 as new tumor markers in BC.¹⁹

The purpose of our study was to determine the diagnostic utility of CXCL12 and CXCR4 as modern tumor markers in patients in first stages of luminal subtypes A or luminal subtypes B BC, and to compare the obtained results to the routinely used marker – CA 15-3. The determination of the studied parameters was also performed in a comparison group (patients with *fibroadenoma*) and a control group (healthy women). The present work is a continuation of the research conducted by our research team on new markers in the diagnosis of breast cancer and gynecological cancers.

Materials and Methods

Participants of the Study

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Medical University of Białystok (R-I-002/239/2014, May 29th 2014; R-I-002/51/2015, February 26th 2015; AKP.002.104.2021 February 25th 2021). Detailed characteristics of each group can be found in [Table 1](#). We included 100 patients with early-stage luminal type A breast cancer (50 patients) and luminal type B breast cancer (50 patients) treated at the Białystok Oncology Center between 2017 and 2022. Control groups consisted of 50 women diagnosed with benign breast lesions (*fibroadenoma*) who also underwent treatment at the Białystok Oncology Center and 50 healthy women. Clinical information – age, menopausal status, tumor diagnosis (histological type, receptor status, stage, location) and applied surgical treatment were obtained from the medical history taken in the diagnostic process by general practitioners and oncologists. For each patient, concomitant diseases, cancer in another location, as well as an active inflammatory process, was further excluded. The patients did not receive any additional preoperative therapy prior to inclusion in the study group. The healthy women participating in the study were either volunteers whose eligibility was determined on the basis of a detailed history and examination by a gynecologist at the University Clinical Hospital in Białystok, or women participating in the BiałystokPLUS cohort study on the basis of extensive examinations (including imaging) performed in the aforementioned project, which had been previously evaluated by a general practitioner or gynecologist. All participants in the study gave written informed consent prior to participation.

Table 1 Descriptive Analysis of Study Participants

Group of Patients	Breast Cancer Group	Luminal A Breast Cancer Subgroup	Luminal B Breast Cancer Subgroup	Fibroadenoma Group	Healthy Women Group
Median age (years)	59,5	60	59	48	52,5
	No. of cases	No. of cases	No. of cases	No. of cases	No. of cases
Age intervals					
≤50 years	28	14	14	24	18
50-70 years	53	28	25	24	29
≥70 years	19	8	11	2	3
Menopause					
Premenopause	–	–	–	–	–
Postmenopause	100	50	50	50	50
Histological type					
Fibroadenoma	–	–	–	50	NA
Ductal carcinoma in situ	5	3	2	–	NA
Invasive Carcinoma of no special type	78	38	40	–	NA
Lobular carcinoma	12	5	7	–	NA
Mucinous adenocarcinoma	5	4	1	–	NA
Receptor status					
ER, PR+; HER2-; ki67<14%	50	50	–	NA	NA
ER, PR+; HER2-; ki67≥14%	44	–	44	NA	NA
ER, PR+; HER2+; ki67 – any value	6	–	6	NA	NA
Tumor stage					
Stage Ia-Ib	68	36	32	NA	NA
Stage IIa	32	14	18	NA	NA

Abbreviations: ER, estrogen receptor; NA, not applicable; PR, progesterone receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

Materials and Assays of the Studied Parameters

Venous blood collected for anticoagulant – sodium heparin – was the material for the study. The blood was centrifuged within 1 hour after the collection at a speed of 1810xG for 10 minutes and then separated and stored at –80°C until the day of the determinations.

The determination of CXCL12 and CXCR4 concentrations was performed by enzyme-linked immunoassay (ELISA) using kits from R&D Systems (Human CXCL12/SDF-1 alpha Quantikine ELISA Kit, Cat. No. DSA00) and FineTest (Human CXCR4 ELISA Kit, Cat. No. EH2136). The assay procedure was carried out according to the manufacturers' instructions included with the kits. Standards and samples were assayed in duplicates. The precision of the assays was specified by the manufacturer for both kits: 3.4% (intra-assay) and 9.4% (inter-assay) for CXCL12, and <8% (intra-assay) and <10% (inter-assay) for CXCR4. The plates were read at 450 nm with the correction set to 540 nm.

Determinations of the plasma level of comparative marker CA 15-3 were performed by the electrochemiluminescence (ECLIA) method using reagents from ROCHE Diagnostics (Elecsys CA 15-3 II) on a Cobas e411 apparatus according to the instructions provided with the reagent kits.

UALCAN Analysis

The University of Alabama at Birmingham CANcer data analysis Portal (UALCAN) (<http://ualcan.path.uab.edu/>) is a tool that allows analysis of OMICS data available in The Cancer Genome Atlas (TCGA) or MET500 databases under

open access policy.^{20,21} Investigation of CXCL12 and CXCR4 mRNA expression in *invasive breast carcinoma* compared to normal breast tissue was conducted using the built-in “TCGA Gene” explorer module.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the results was performed using the statistical program PQStat Software (v.1.8.4.162, Poznań, Poland), while graphical processing by GraphPad Prism Software (v. 9.1.1 (225), San Diego, California, United States). Analysis of normality of distribution was assessed by the Shapiro–Wilk test. Subsequently, the analysis was based on non-parametric tests – Kruskal–Wallis test with Conover-Iman post hoc test when comparing groups, and Spearman rank correlation test when examining correlations between parameters. The analysis of diagnostic reliability and diagnostic power of the tests was based on the ROC curve with the determined optimal cut-off point of 2.733 ng/mL for CXCL12, 1337.62 pg/mL for CXCR4 and 19.7 IU/mL for CA 15-3. The comparison of ROC curves was based on the evaluation of AUC values determined by DeLong’s nonparametric method.

Results

mRNA Expression of CXCL12 and CXCR4 in Breast Cancer

Analysis of mRNA expression showed that compared to healthy tissues, CXCL12 mRNA level was significantly lower ($p < 0.0001$) (Figure 1A), while CXCR4 mRNA was significantly higher in BC tissues ($p < 0.0001$) (Figure 2A). These results have also been confirmed by other teams of scientists involved in genomic database analysis.^{22–29}

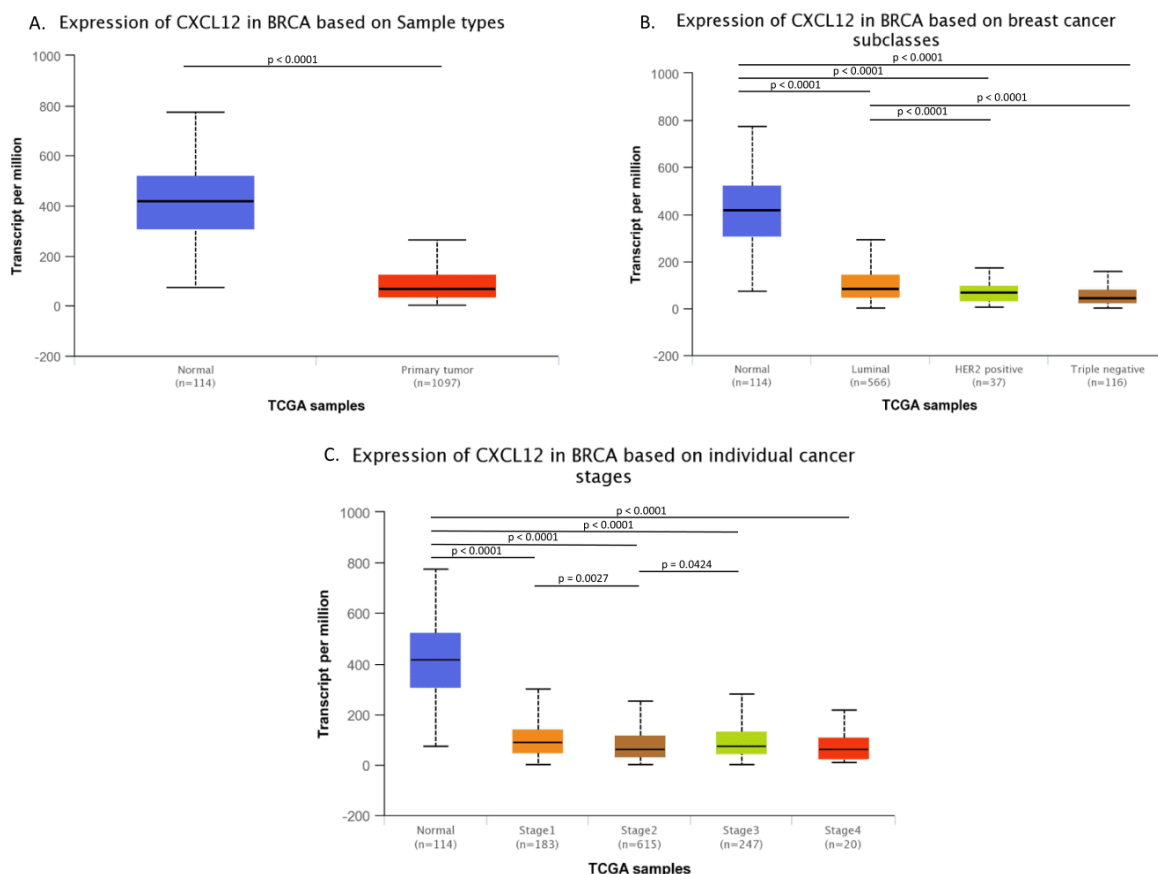


Figure 1 Analysis of CXCL12 mRNA expression levels in BC tissues. (A) Comparison of CXCL12 mRNA expression between BC and healthy tissue. (B) Comparison of CXCL12 mRNA expression between different BC subtypes. (C) Comparison of CXCL12 mRNA expression between different stages of BC.

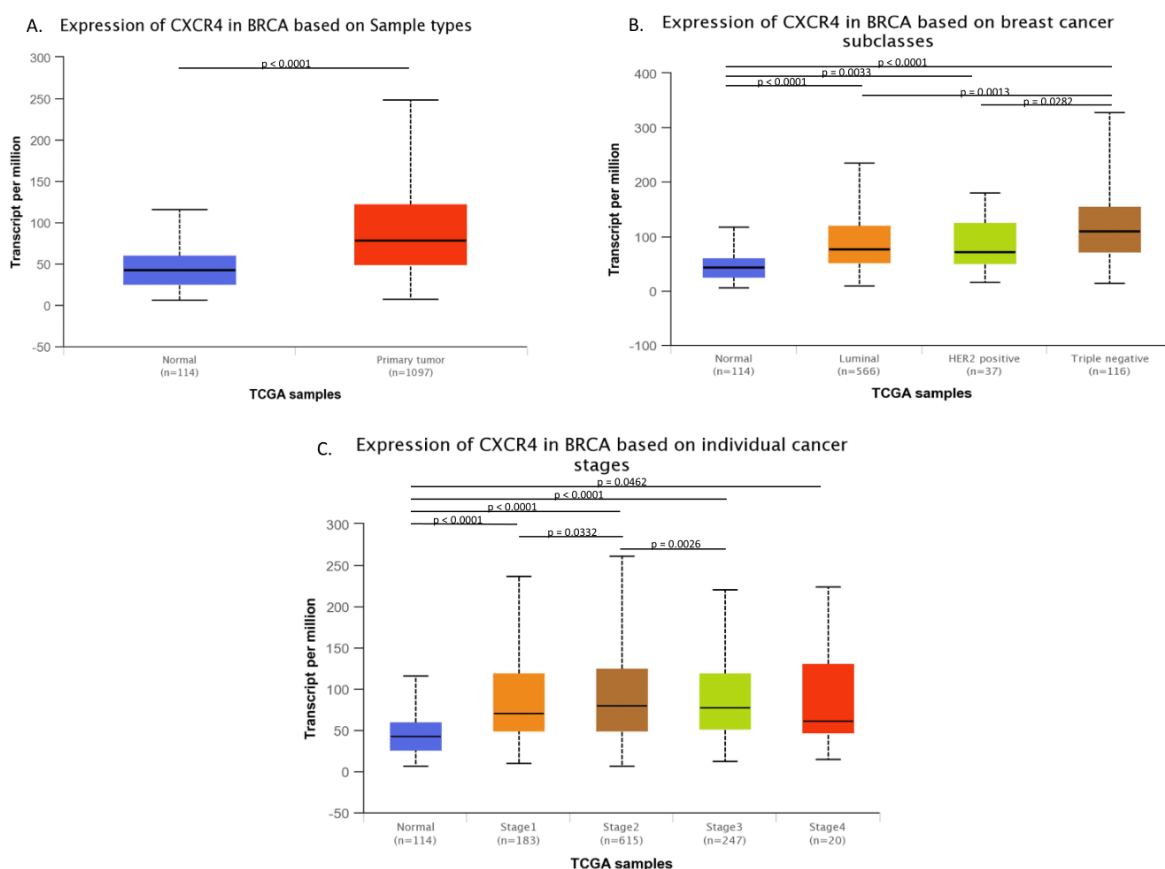


Figure 2 Analysis of CXCR4 mRNA expression levels in BC tissues. **(A)** Comparison of CXCR4 mRNA expression between BC and healthy tissue. **(B)** Comparison of CXCR4 mRNA expression between different BC subtypes. **(C)** Comparison of CXCR4 mRNA expression between different stages of BC.

Further analysis of individual molecular subtypes showed that CXCL12 mRNA levels were significantly lower in TNBC ($p < 0.0001$) and HER2 ($p < 0.0001$) subtypes of BC than in luminal subtypes. However, no statistically significant differences were observed between TNBC and HER2 subtype (Figure 1B). The same results were obtained by the teams of Chen et al,²³ Li et al,²⁴ Mehraj et al²⁵ and Wu et al.²⁹ However, the relationship between BC subtypes and CXCL12 expression was not shown by the teams of Hozhabri et al²² and Liu et al.²⁶

We also noted a difference in CXCR4 mRNA expression in different BC subtypes (Figure 2B). TNBC showed higher expression compared to luminal ($p = 0.0013$) and HER2 subtypes ($p = 0.0282$), while there were no differences in expression levels between HER2 and luminal subtypes. These results are in agreement with those obtained by Wu et al,³⁰ Guo et al²⁸ and Chuan et al.²⁷

The mRNA expression of CXCL12 and CXCR4 did not correlate among breast cancer patients, nor its level differ in individual stages (Figures 1C and 2C), which is supported by reports from other researchers,^{24,26} although, several scientific reports have noted an association between lower CXCL12 expression and poorly differentiated tumor cells.^{22,23}

Plasma Concentration of CXCL12, CXCR4 and CA 15-3 in Breast Cancer Patients

Data concerning plasma level of CXCL12, CXCR4 and comparative marker CA 15-3 are presented in Table 2 and Figures 3–5. Analyzing the results in the entire study group of women with early-stage BC, we noted that CXCL12 (2.433 ng/mL) showed significantly lower plasma concentrations compared to the group of healthy women (2.920 ng/mL, $p < 0.001$) (Figure 3). We also noticed significant differences between the group of BC patients and healthy women in the

Table 2 Concentrations of CXCL12, CXCR4 and CA 15-3 in Individual Study Groups (Median Concentrations and Interquartile Ranges (IQR))

	CXCL12 [ng/mL]	CXCR4 [pg/mL]	CA 15-3 [IU/mL]
BC group			
MEDIAN	2.433	1525.32	20.95
IQR	2.157–2.690	432.63–3059.10	14.08–26.93
Luminal A BC subgroup			
MEDIAN	2.479	1676.04	21.86
IQR	2.307–2.710	732.17–2948.01	13.60–27.70
Luminal B BC subgroup			
MEDIAN	2.323	1343.65	20.27
IQR	1.963–2.676	768.25–3859.41	14.43–26.50
Fibroadenoma group			
MEDIAN	2.503	1017.64	17.55
IQR	1.463–3.171	432.63–2386.01	10.97–24.72
Healthy women group			
MEDIAN	2.920	1149.23	16.65
IQR	2.804–3.171	931.45–1310.34	10.54–21.48

concentrations of CXCR4 and the comparative marker CA 15-3. CXCR4 (1525.32 pg/mL) (Figure 4) and CA 15-3 (20.95 IU/mL) (Figure 5) showed significantly higher levels in the BC group than in the control group of healthy women (CXCR4 1149.23 pg/mL, $p = 0.041$; CA 15-3 16.65 IU/mL, $p = 0.004$). Solely for CXCR4, the concentrations among patients with BC were significantly higher relative to women with benign lesions - fibroadenoma (1017.64 pg/mL, $p = 0.043$).

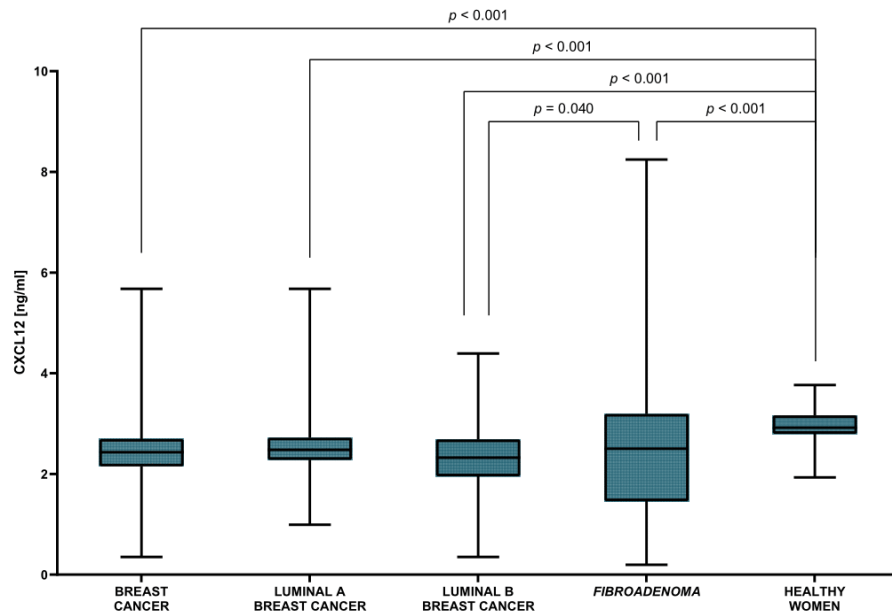


Figure 3 CXCL12 concentrations in the study groups (including luminal A and B subgroups of BC) and control groups (fibroadenoma and healthy women). On the graphs were plotted the values of the median, interquartile range and the minimum and maximum values. Clusters indicate statistically significant differences between particular groups.

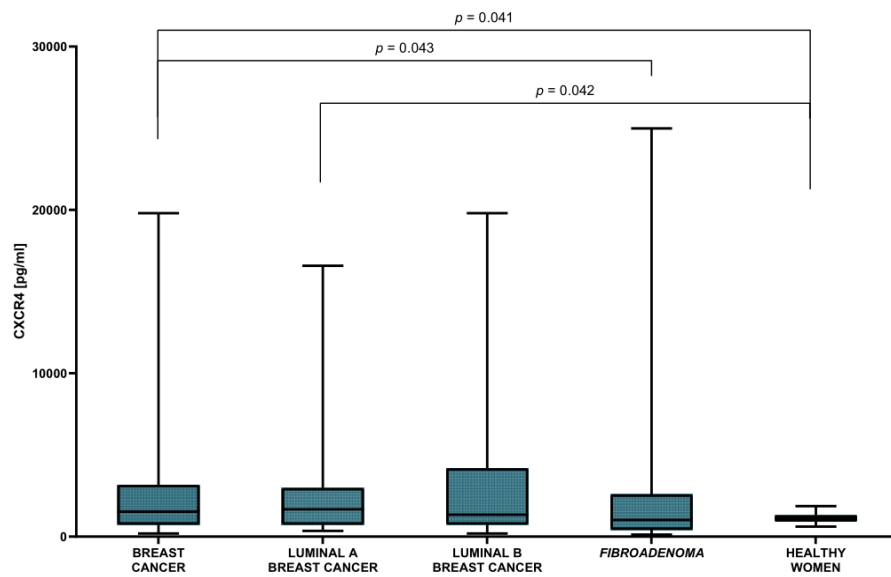


Figure 4 CXCR4 concentrations in the study groups (including luminal A and B subgroups of BC) and control groups (*fibroadenoma* and healthy women). On the graphs were plotted the values of the median, interquartile range and the minimum and maximum values. Clusters indicate statistically significant differences between particular groups.

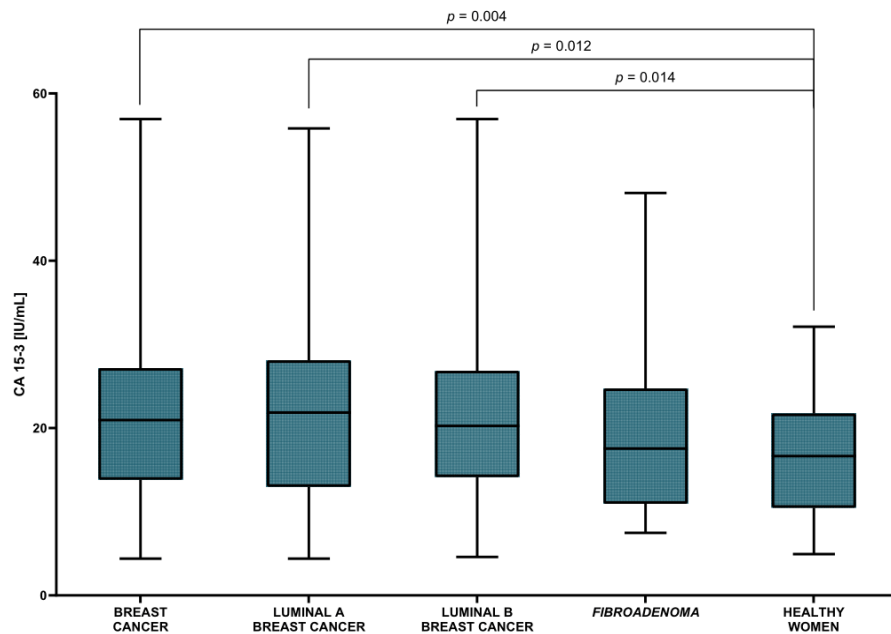


Figure 5 CA 15-3 concentrations in the study groups (including luminal A and B subgroups of BC) and control groups (*fibroadenoma* and healthy women). On the graphs were plotted the values of the median, interquartile range and the minimum and maximum values. Clusters indicate statistically significant differences between particular groups.

Additionally, we noted that the group of women with *fibroadenoma* showed significantly lower levels of CXCL12 (2.503 ng/mL) compared to the control group of healthy women (CXCL12, $p < 0.001$), which we did not observe for the CXCR4, nor the comparative marker CA 15-3 (Figures 3–5).

Looking at the individual luminal subgroups of BC, we noted that, compared with the group of healthy women, CXCR4 (1676.04 pg/mL, $p = 0.042$) and CA 15-3 (21.86 IU/mL, $p = 0.012$) showed significantly higher concentrations for the luminal A subgroup, while CXCL12 significantly lower concentrations in the luminal A subgroup (2.479 ng/mL, $p < 0.001$). Analogous results to the luminal A subgroup were obtained for CXCL12 and the comparative marker in luminal B BC subgroup – higher CA 15-3 level (20.27 IU/mL, $p = 0.014$) and lower CXCL12 level (2.323 ng/mL, $p < 0.001$) when compared to the control group of healthy women (Figures 3–5). In addition, in the luminal B BC subgroup, we observed significantly lower concentrations of CXCL12 alone (2.323 ng/mL) with respect to the group of women with benign breast lesions (2.503 ng/mL, $p = 0.040$) (Figure 3). CXCR4 was found to display no statistically significant differences between the luminal B subgroup of BC patients and the control groups.

Correlation Analysis on Plasma Parameters Under Study

When examining the correlations between plasma level of CXCL12, CXCR4 and CA 15-3, we observed a positive correlation only between CXCL12 and CXCR4 in the group of women with benign breast lesions ($r = 0.4089$, $p = 0.003$) and a weak negative correlation between CXCL12 and CXCR4 in the control group of healthy women ($r = -0.2980$, $p = 0.036$). In contrast, we did not observe any correlations between the parameters studied in the group of women with BC. The result of the analysis is presented as heatmaps of correlation matrix (Figure 6).

Analysis of Diagnostic Reliability and Diagnostic Power of Tests

The diagnostic reliability of a test is determined by the values of diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy. Table 3 reports the values for the reliability parameters for the analyzed tests – univariate and multivariate parameters formed out of combinations of the determined compounds and a comparative marker.

Investigating the entire group of BC patients, the highest values of diagnostic reliability were shown by CXCL12 reaching 79% for sensitivity, 82% for specificity, 89.72% for positive predictive value, 66.13% for negative predictive

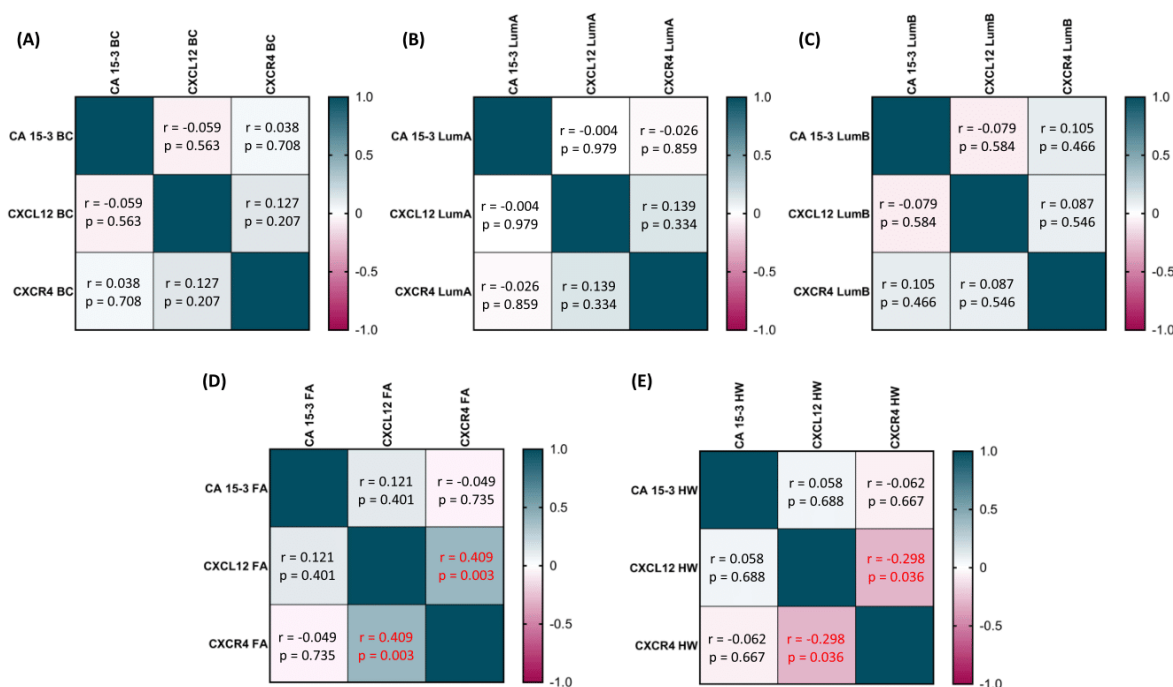


Figure 6 Heatmaps of correlation matrix for tested groups: (A) – BC total group of patients, (B) – luminal A subgroup (LumA) of patients, (C) – luminal B subgroup (LumB) of patients, (D) – women with fibroadenoma (FA), (E) – healthy women (HW).

Table 3 Diagnostic Reliability of Univariate and Multivariate Parameters in the Respective Study Groups

Parameter	Diagnostic Reliability				
	Sensitivity [%]	Specificity [%]	Positive Predictive Value [%]	Negative Predictive Value [%]	Accuracy [%]
Breast cancer group					
CXCL12	79.00	82.00	89.77	66.13	80.00
CXCR4	55.00	80.00	85.32	47.06	63.33
CA 15-3	58.00	72.00	80.56	46.15	62.67
CXCL12 + CA 15-3	92.00	58.00	81.42	78.38	80.67
CXCR4 + CA 15-3	81.00	58.00	79.41	60.42	73.33
CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3	96.00	48.00	78.69	85.71	80.00
Luminal A breast cancer subgroup					
CXCL12	78.00	82.00	81.25	78.85	80.00
CXCR4	58.00	80.00	74.36	65.57	69.00
CA 15-3	60.00	72.00	68.18	64.29	66.00
CXCL12 + CA 15-3	92.00	58.00	68.66	87.88	75.00
CXCR4 + CA 15-3	82.00	58.00	66.13	76.32	70.00
CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3	98.00	48.00	65.33	96.00	73.00
Luminal B breast cancer subgroup					
CXCL12	80.00	82.00	81.63	80.39	81.00
CXCR4	52.00	80.00	72.22	62.50	66.00
CA 15-3	65.00	72.00	66.67	62.07	64.00
CXCL12 + CA 15-3	92.00	58.00	68.66	87.88	75.00
CXCR4 + CA 15-3	80.00	58.00	65.57	74.36	69.00
CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3	94.00	48.00	64.38	88.89	71.00

value and 80% accuracy, thus significantly surpassing the values shown for the comparative marker CA 15-3 (58%, 72%, 82.56%, 46.15% and 62.67% respectively). Similarly high value of diagnostic specificity as CXCL12 was achieved by CXCR4 (80%), with a simultaneously similar positive predictive value (85.32%) and much lower sensitivity (55%), negative predictive value (47.06%) and accuracy (63.33%). Despite this, all the diagnostic indicators for CXCR4, with the exception of diagnostic sensitivity, further exceeded the corresponding values obtained for the comparative marker CA 15-3. The analysis of combined parameters increased the values of sensitivity, negative predictive value and accuracy of the test at the expense of a slight decrease in positive predictive value and a more pronounced decrease in diagnostic specificity. In the case of combined panels, the highest values of sensitivity (96%) and negative predictive value (85.71%) were obtained for the three-parametric test CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3 with a high value of accuracy of 80% and at the same time the lowest recorded specificity of the test (48%). Among the analyzed multivariate panels, the highest specificity (58%), positive predictive value (81.42%) and accuracy (80.67%) were achieved by the two-parametric test CXCL12 + CA 15-3 with simultaneous high rates of sensitivity (92%) and negative predictive value (78.38%).

Analyzing the individual luminal subgroups of BC, CXCL12 showed the highest values of all diagnostic reliability indices in both the subgroup of patients with luminal A and luminal B BC, matching the results obtained for the total study group (Table 3), in the same time outperforming the comparative marker CA 15-3 in all aspects. In the subgroup of patients with luminal A BC, CXCR4 showed higher values of positive predictive value (74.29%), negative prognostic value (65.57%) and accuracy (67%) than the comparative marker CA 15-3 (68.18%; 64.29%; 66%, respectively). However, CA 15-3 had slightly higher sensitivity value (60%) than CXCR4 (58%). Analyzing the subgroup of patients with luminal B BC, again we obtained corresponding, and only the sensitivity value of CXCR4 (52%) was lower than that of the comparative marker CA 15-3 (65%), while the rest of the CXCR4 indicators were superior to those determined for CA 15-3 (Table 3). Analysis of the combined panels of parameters in both luminal subgroups showed

identical trends of change to their diagnostic reliability indicators as for the entire group of BC patients. In both the luminal A and luminal B subgroups of patients, the highest values of sensitivity (98% for luminal A and 94% for luminal B subgroup) and negative predictive value (96% for luminal A and 88.89% for luminal B subgroup) were achieved by the three-parameter test CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3. In contrast, the highest positive predictive value (68.66% for both luminal subgroups) and accuracy (75% for both luminal subgroups) were characterized by the two-parametric test of CXCL12 + CA 15-3. It is also worth noting, that for the two-parametric test CXCL12 + CA 15-3, the values of sensitivity (92% for both luminal subgroups) and positive predictive value (87.88% for both luminal subgroups) were quite similar to those obtained for the three-parametric test.

The diagnostic power of a test is assessed by plotting sensitivity against the percentage of false positives (1 – specificity), called the receiver operating curve (ROC). The area under the ROC curve (AUC) is thus a measure of a test’s ability to accurately distinguish between normal and abnormal results, and the greater the AUC, the more powerful is the test. The AUC = 0.5 is considered to be the limit of the diagnostic usefulness of the test, to which the tested assays are compared and the p-value is determined. The results of the analysis of the ROC curves for the tested parameters (CXCL12, CXCR4, the reference marker CA 15-3) and their combinations are presented in Table 4. In addition, the ROC curves for the multivariate panels were compared to the ROC curve for the reference marker CA 15-3 in order to assess the possible improvement in the predictive ability (p-value against $AUC_{CA\ 15-3}$).

ROC curve graphs for the total study group of BC patients are shown in Figure 7. In the total group of patients, significance against AUC = 0.5 was demonstrated for all tested parameters including multivariate parameters. The highest diagnostic power of the test was demonstrated by CXCL12 (AUC = 0.8196) with significantly better predictive ability than the comparative marker CA 15-3 (AUC = 0.6434, $p_{CA\ 15-3} = 0.003$). The diagnostic power and quality of the test demonstrated for CXCR4 was at a comparable level to the comparative marker CA 15-3 (Table 4). Analysis of

Table 4 ROC Curves Characteristics for Univariate and Multivariate Parameters in the Respective Study Groups with the Assessment of the Quality of the Test Against the Comparative Marker CA 15-3

Parameter	AUC	SE (AUC)	95% C.I.	p (AUC=0.5)	$p_{CA\ 15-3}$ (AUC _{CA 15-3})
Breast cancer group					
CXCL12	0.8196	0.0367	0.7476–0.8916	<0.001	0.003
CXCR4	0.6054	0.0456	0.5161–0.6947	0.036	0.838
CA 15-3	0.6434	0.0460	0.5533–0.7335	0.004	–
CXCL12 + CA 15-3	0.8292	0.0343	0.7620–0.8964	<0.001	<0.001
CXCR4 + CA 15-3	0.7184	0.0405	0.6390–0.7978	<0.001	0.025
CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3	0.8812	0.0274	0.8275–0.9349	<0.001	<0.001
Luminal A breast cancer subgroup					
CXCL12	0.7952	0.0482	0.7008–0.8896	<0.001	0.039
CXCR4	0.6184	0.0641	0.4928–0.7440	0.041	0.972
CA 15-3	0.6422	0.0564	0.5316–0.7528	0.014	–
CXCL12 + CA 15-3	0.8184	0.0438	0.7326–0.9042	<0.001	<0.001
CXCR4 + CA 15-3	0.7196	0.0538	0.6141–0.8251	<0.001	0.119
CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3	0.8736	0.0357	0.8037–0.9435	<0.001	<0.001
Luminal B breast cancer subgroup					
CXCL12	0.8440	0.0412	0.7633–0.9247	<0.001	0.005
CXCR4	0.5924	0.0623	0.4697–0.7151	0.111	0.781
CA 15-3	0.6446	0.0551	0.5366–0.7526	0.013	–
CXCL12 + CA 15-3	0.8400	0.0406	0.7604–0.9196	<0.001	<0.001
CXCR4 + CA 15-3	0.7136	0.0527	0.6104–0.8168	<0.001	0.107
CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3	0.9048	0.0301	0.8459–0.9637	<0.001	<0.001

Note: Values of p<0.05 are indicated in red.

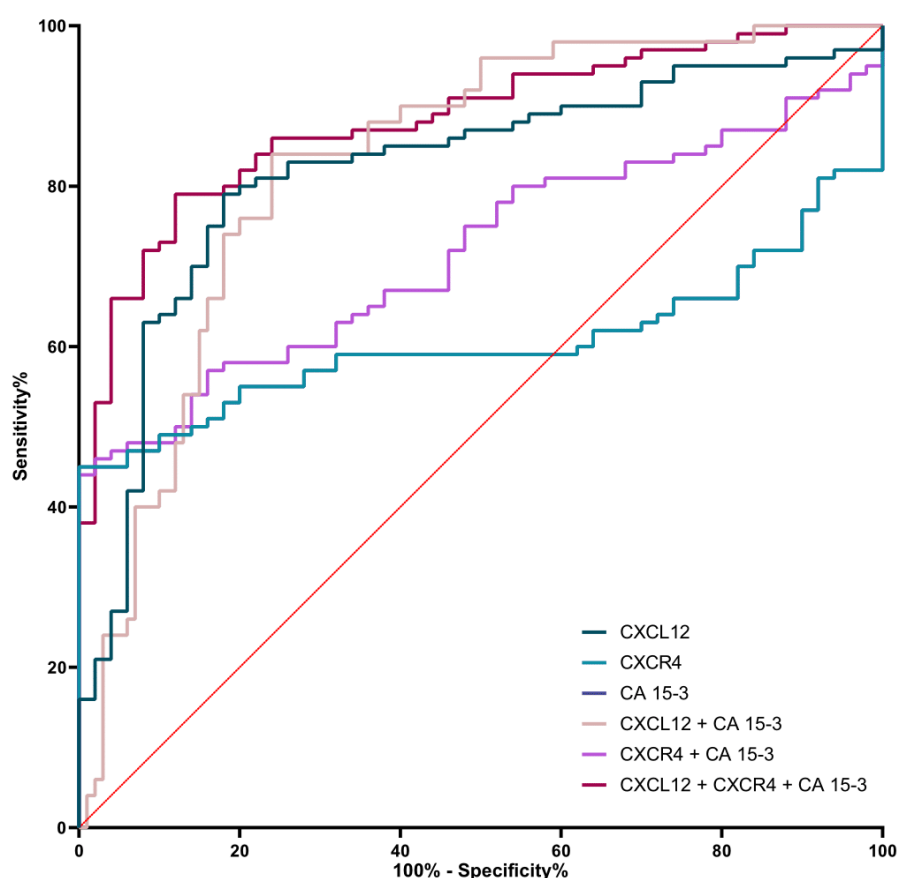


Figure 7 ROC curves of univariate and multivariate parameters in a group of BC patients.

combined parameters increased the value of diagnostic power reaching the maximum value for the three-component parameter CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3 (AUC = 0.8812), significantly increasing the quality of the test of a comparative marker CA 15-3 ($p_{CA\ 15-3} < 0.001$). Similar AUC value to the three-parametric test was also shown by the two-parametric combination of CXCL12 + CA 15-3 reaching AUC = 0.8292.

ROC curve plots for the subgroup of patients with luminal A BC are shown in Figure 8. All tested parameters, together with multivariate parameters, showed significant diagnostic power relative to AUC = 0.5. Similarly to the entire study group, CXCL12 (AUC = 0.7952, $p_{CA\ 15-3} = 0.039$) showed the highest diagnostic power superior to the comparative marker CA 15-3 (AUC = 0.6422). CXCR4 again achieved comparable, albeit lower values of diagnostic power of the assay (AUC = 0.6184) relative to CA 15-3. Combining parameters into multivariate test increased the diagnostic power of the assay, which reached the highest value again for the three-parametric combination CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3 (AUC = 0.8736) showing a significant improvement in the quality of the assay in relation to the comparative marker CA 15-3 ($p_{CA\ 15-3} < 0.001$).

ROC curve graphs for the subgroup of patients with luminal B BC are shown in Figure 9. Again, the studied parameters, excluding CXCR4, along with their multivariate parameters, showed significant diagnostic power relative to AUC = 0.5. CXCL12 achieved the highest diagnostic power (AUC = 0.8440), thus significantly outperforming the comparative marker CA 15-3 (AUC = 0.6446, $p_{CA\ 15-3} = 0.005$). CXCR4 was once again characterized by a lower diagnostic power (AUC = 0.5924) relative to the comparative marker. In terms of combined panels, the highest value of diagnostic power was demonstrated by the three-parametric test CXCL12 + CXCR4 + CA15-3 (AUC = 0.9048), which was the only one combination that exceeded the value of diagnostic power demonstrated by the both comparative marker and the best single parameter – CXCL12.

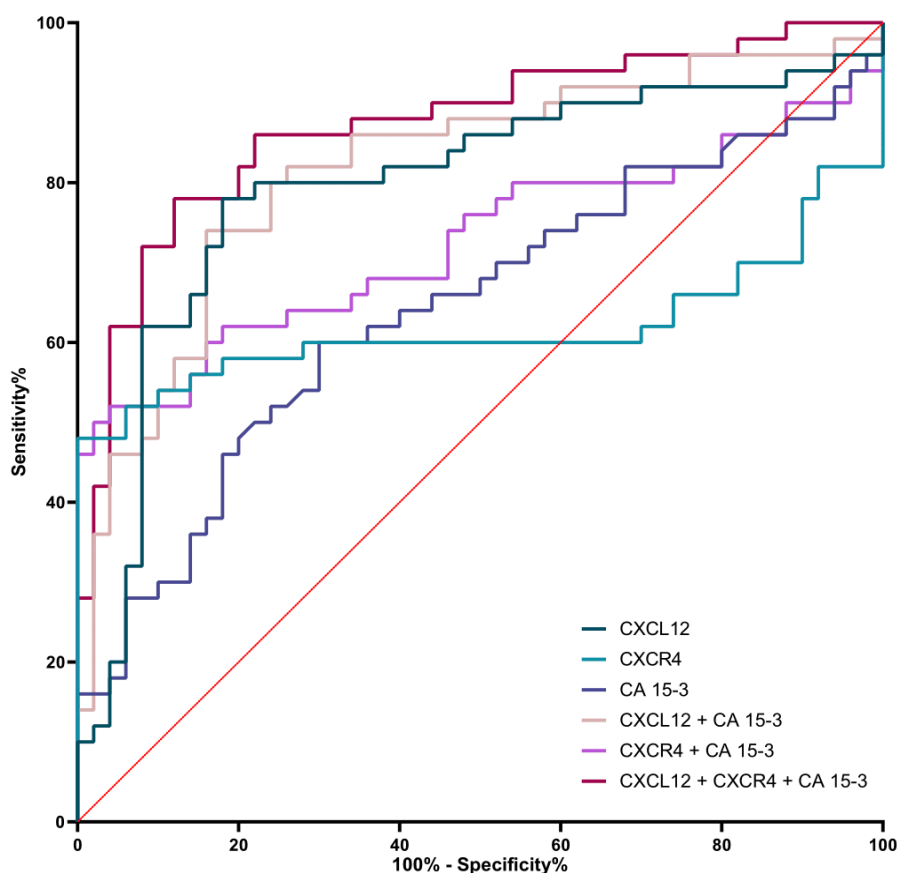


Figure 8 ROC curves of univariate and multivariate parameters in a group of in a luminal A BC subgroup of patients.

Discussion

BC is the most common malignancy among women, and many interrelated factors such as genetic or environmental conditions contribute to the onset of this disease.^{1,3,4} Despite the high heterogeneity of the disease, BC detected at an early stage has a good prognosis; however, most women are diagnosed at a more advanced stage – despite the existence of effective screening and preventive tests.^{3,5} This translates into the need to search for and introduce into health care systems, new methods of diagnosing BC. High hopes are placed on the determination of tumor markers from peripheral blood, which is a fast and minimally invasive method.³ However, the markers currently used in the diagnosis of BC are not very specific, which raises the need for the introduction into widespread use of new molecules that could be used as markers.⁶ These may include chemokines such as CXCL12 and its receptor, CXCR4.

The aim of the present study was to determine CXCL12 and CXCR4 concentrations in plasma and to determine the diagnostic utility of these molecules as new BC markers. In addition, the results were related to two control groups (benign breast lesions and healthy subjects) as well as compared with CA 15-3, which is a routinely used marker for BC diagnosis.

In the pathogenesis of BC, an important role is played by the CXCL12/CXCR4 axis, especially at the tumor progression. The action of this axis was primarily associated with negative cellular phenomena such as increased proliferation, migration and invasion what related to tumor weight gain *in vivo*.^{31–34} The CXCL12/CXCR4 axis is also responsible for the increased metastatic potential of cells resulting in a higher likelihood of metastatic foci in female patients.^{31,35,36} An especially unfavorable property of this axis arose from the induction of angiogenesis which has been linked to both an increase in tumor weight and an elevated risk of metastasis.^{32,37}

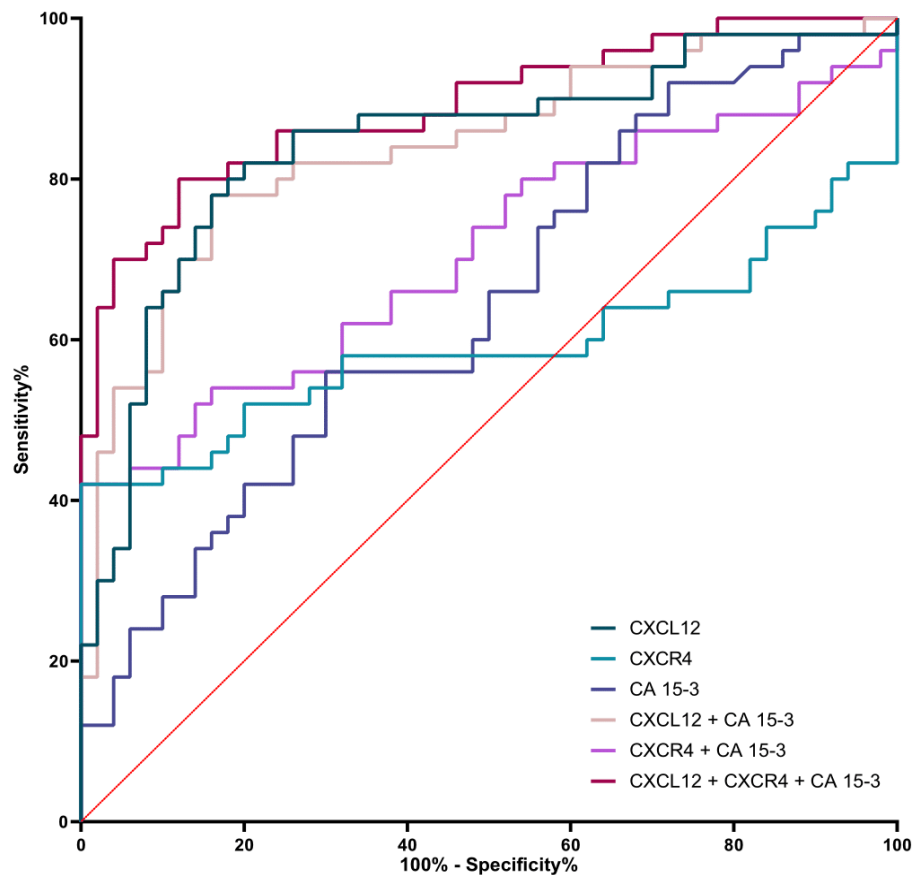


Figure 9 ROC curves of univariate and multivariate parameters in a group of luminal B BC subgroup of patients.

Expression of both CXCL12 and CXCR4 has been demonstrated in various tumor types such as kidney cancer,³⁸ esophageal cancer³⁹ or ovarian cancer.⁴⁰ In the case of BC patients, the presence of CXCL12 was found in the nucleus and cytoplasm, while CXCR4 was found in the membrane and cytoplasm of tumor cells.¹⁵ In addition, according to a study by Mirisola et al⁴¹ expression of both axis components is also found in the stroma of the cancerous lesion. Immunohistochemical CXCL12 expression positively correlated with BC stage according to the TNM classification, while CXCR4 expression was associated with the presence of lymph node metastasis and TNM stage.¹⁵ However, data analyzing CXCL12 and CXCR4 mRNA expression clearly contradicts the existing correlation between mRNA levels and BC stage.^{24,26} Additionally, slightly disparate information can be found on the level of CXCL12 expression and the association with overall survival and relapse-free survival in estrogen receptor-positive and -negative BC.^{21–26,29,30,41} In the majority of reports, nevertheless, higher CXCL12 mRNA expression is associated with a longer relapse-free survival period as well as longer overall survival time.^{22–24,26}

We are now the first research team to determine the diagnostic utility of CXCL12 and CXCR4 in BC patients with luminal A and luminal B subtypes determined as a tumor marker from plasma. Our study is a continuation of the study conducted by Dąbrowska et al¹⁹ whose team determined the diagnostic utility of CXCL12 and CXCR4 as markers in BC without an isolated histological subtype; therefore, our results will be partially referred to the results obtained by said research team. We used plasma as the study material, which was selected on the basis of previous experiments conducted by our research team.^{3,7,19}

In our study, the obtained concentrations of CXCL12 and CXCR4 were compared with those obtained in healthy women and patients with benign lesions - *fibroadenoma*, and related to the routinely used marker CA 15-3. The selection

of patients with *fibroadenoma* as a comparison group and the routine marker CA 15-3 is dictated by previous experience and indicates the correct methodology of our study.^{3,7,19}

In our study, the levels of CXCL12/CXCR4 axis components were dysregulated – CXCL12 concentrations were lower, while CXCR4 concentrations – higher, in patients with BC compared to healthy women and patients with benign lesions (*fibroadenoma*). This partly disagrees with the results obtained by Dąbrowska et al¹⁹ who finds higher concentrations of CXCL12 in BC women compared to healthy women and *fibroadenoma* patients. However, the results of the CXCR4 concentrations are in line with the results obtained by the team of Dąbrowska et al¹⁹ and Frayyeh et al,⁴² where higher concentrations of CXCR4 are also found among women with BC compared to healthy volunteers.^{19,42} The differences between the results may be due to several variables. First, our study included patients with BC of luminal subtype A or B, in contrast to the work of Dąbrowska et al¹⁹ who did not distinguish the molecular subtype of BC in their papers. Secondly, the patients in our study group were only in stage I or II, in contrast to the works of Dąbrowska et al¹⁹ whose studies included patients in all stages of cancer, resulting in a significantly smaller study group with early BC patients. The heterogeneity of the study groups selected by the previous research team may have resulted in such large differences between the acquired results.

Our findings revealed no difference in the concentrations of both CXCL12 and CXCR4, as well as comparative marker CA 15-3, between BC patients of luminal A and luminal B. Unfortunately, we do not have the opportunity to relate our findings to the results obtained by other teams, since we are the first research team to make this kind of finding. It should be noted, however, that in our previous studies of luminal subtypes of BC, we also did not observe dependencies of CXCL1, CXCL8 nor CA 15-3 concentration between luminal A and luminal B subgroups.³

According to our study, CA 15-3 concentrations were higher in women with BC than in healthy volunteers. This agrees with the results obtained in previous experiments and indicates that the determination of the comparative marker was performed correctly.^{3,7,19}

Using sensitivity and specificity, positive and negative predictive value, we determined the diagnostic reliability of the studied parameters. We revealed that in the BC group, CXCL12 (sensitivity 79%; specificity 82%; positive predictive value 89.77%; negative predictive value 66.13%) and CXCR4 (55%; 80%; 84.42%; 47.06%, resp.) showed higher or comparable values for all diagnostic parameters compared to the routine marker CA 15-3 (58%; 72%; 80.56%; 46.15%, resp.). This differs from the study of Dąbrowska et al¹⁹ who found higher values for CXCL12 only for sensitivity (74.23%) and negative predictive value (64.29%) compared to CA 15-3 (59%; 58.06%, respectively) for total group of patients. Similar results to Dąbrowska et al team was provided by team Łukaszewicz-Zajac et al¹⁸ who, in patients with esophageal cancer, also found higher only sensitivity and negative predictive value values for CXCL12 than for the cancer biomarker, CEA.

Viewing the different subgroups selected in the Dąbrowska et al study,¹⁹ the team observed higher sensitivity values (58.82%) and comparable negative predictive value values (76.12%) for CXCL12 relative to CA 15-3 (50%; 76.06%, respectively) for the stage I BC patients group, while specificity (71.43%) and positive predictive value (52.63%) values were lower for CXCL12 than for the comparative marker CA 15-3 (85.71%; 65.38%, resp.).¹⁹ In the stage II BC patients group, CXCL12 showed higher both sensitivity (78.05%) and negative predictive value (83.33%) and lower positive predictive value (64%) than CA 15-3 (53.66%; 73.97%; 70.97%, resp.). The results obtained for CXCL12 in the group of patients with stage II cancer in the study by Dąbrowska et al¹⁹ reached similar values or – for stage I cancer patients – lower values of diagnostic parameters compared to those obtained in our study for the whole group of patients with early-stage BC, which, despite the differences in the direction of changes in CXCL12 concentrations, seems to confirm the assumed clinical utility of CXCL12 as a marker of BC.

On the other hand, the diagnostic reliability for CXCR4 obtained by Dąbrowska et al¹⁹ for all-stages BC patients (sensitivity 59.80%; specificity 65.08%; positive predictive value 72.50%; negative predictive value 51.25%) was lower than for CA 15-3 (59.79%; 85.75%; 86.57%; 58.06%, resp.). Interestingly, when analyzing the results only for stage I and II BC patients in Dąbrowska et al study,¹⁹ CXCR4 showed a higher sensitivity (stage I: 64.71%; stage II: 60.98%), comparable negative predictive value (stage I: 77.36%; stage II: 71.93%) and lower positive predictive value (stage I: 50%; stage II: 53.19%) than CA 15-3 (stage I: 50%, 76.06%, 65.38%; stage II: 53.66%, 73.97%, 70.97%, resp.). Similar dependencies were also noted by the Łukaszewicz-Zajac et al team,¹⁸ obtaining higher sensitivity (80%) and negative predictive value (63%) for CXCR4 than for the comparison marker CEA (22%; 42%, resp.). Those results are partially consistent with the results

obtained for CXCR4 in our study, where we noted higher specificity (82%), positive predictive value (85.49%) and negative predictive value (47.67%) for CXCR4 than for routinely used marker CA 15-3 (72%; 80.56%; 46.15%, resp.).

For the multiparameter analysis, we observed an increase in sensitivity and negative predictive value, which was also observed by the Dąbrowska et al team.¹⁹ Combining CXCL12 and CA 15-3 into a two-parameter test resulted in an increase in sensitivity values of up to 73.53% and negative predictive value values of up to 80.85% for the subgroup of patients with stage I BC and 85.37% and 86.36% for patients with stage II BC in the Dąbrowska et al study.¹⁹ In our study, there was a stronger increase in sensitivity values up to 92%, and a comparable increase in negative predictive value values to 78.36%. It is noteworthy that combining parameters in the CXCL12 + CA 15-3 pairing slightly reduced the positive predictive value in both works, and more markedly the specificity value. Nevertheless, the specificity level in both works for CXCL12 + CA 15-3 remained around 60%. When performing combined analysis of the three parameters, we noted the highest values of sensitivity (96%) and negative predictive value (85.71%). This agrees with the results of Dąbrowska et al¹⁹ who also found an increase in sensitivity (stage I: 88.24%; stage II: 92.68%) and negative predictive value (stage I: 84.62%; stage II: 88%) when the three-parameter test was performed. Simultaneously, it is worth noting that the three-parametric analysis in our work significantly exceeded the sensitivity (96%) and positive predictive value (78.69%), as well as by a smaller margin – the specificity (48%) and negative predictive value (85.71%) than then three-parametric combination of CXCL12, CXCR4 and CA 15-3 in the work of Dąbrowska et al¹⁹ for both early BC subgroups (stage I: 88.24%, 42.25%, 34.92%, 84.62%; stage II: 92.68%, 48.1%, 34.92%, 88%, resp.).¹⁹ The study by Łukaszewicz-Zajac et al¹⁸ did not analyze the combination of the three parameters; however, an evaluation of the combination of CXCL12 + CXCR4 was performed, where high values of sensitivity (84%), positive predictive value (71%) and negative predictive value (79%) were also achieved, along with a comparable low value of specificity (37%) as to both the results obtained in our study and the study by Dąbrowska et al for the CXCL12 + CXCR4 + CA 15-3 test.

With the help of the AUC, we assessed the power of the test. The highest power of the test in all study groups was revealed for CXCL12 (0.8196), which agrees with the results of Dąbrowska et al¹⁹ who also found the highest AUC, albeit lower than in our study, for CXCL12 (0.7502) in the BC total group. In our study, the AUC obtained for CXCR4 in all study groups (BC total group 0.6054; luminal A subgroup 0.6184; luminal B subgroup 0.5924) was lower to the AUC for CA 15-3 (sequentially: 0.6434; 0.6422; 0.6446) which is in agreement with the results of previous teams. Dąbrowska et al team showed that in the BC total group, as well as in stage I and stage II of BC, CXCR4 had similar AUC values (sequentially: 0.6239; 0.6629; 0.66210), which were also lower than for CA 15-3 (sequentially: 0.7354; 0.6452; 0.7163).¹⁹ Interestingly, comparable AUC values for CXCR4 and the comparative marker were also obtained by Łukaszewicz-Zajac et al¹⁸ studying patients with esophageal cancer. In our study, when performing two- or three-parametric analyses, the AUC values increased, which is in line with the experience of Dąbrowska et al¹⁹ who also finds a similar relationship in all studied BC groups.

The puzzling results noted in our study, which we are unfortunate not able to confirm by the lack of other work, concerns CXCL12 and CXCR4 plasma concentrations with regard to its mutual correlation. The lack of correlation in all BC studied groups, positive correlation between CXCL12 and CXCR4 concentrations in the group of women with benign lesions and the negative correlation between the same parameters in the group of healthy women that we observed seem to be a logical consequence of the changes taking place in the breast. The reversal of the balance between CXCL12 and CXCR4 in the development of a benign lesion in relation to the physiological situation, and complete imbalance in a malignant lesion seems to be a potential new target for further expanded research. However, this thesis requires verification on larger groups of subjects and with studies conducted by other research teams.

Conclusion

According to our results, CXCL12 and CXCR4 performed simultaneously with the determination of the routine marker CA 15-3, especially combined as three-parametric test, may be considered in the future as a diagnostic marker for early BC, particularly for luminal subtypes A and B. However, it is unfortunate that our study has some limitations. First, we only included patients with luminal subtype A and B BC in the study, making us unable to determine the diagnostic utility of CXCL12 and CXCR4 in other subtypes of the disease. Secondly, in our study, we did not determine the concentrations and utility of CXCR7 (ACKR3), the atypical receptor for CXCL12, thereby not fully evaluating the overall ligand-receptor axis

for CXCL12. Nevertheless, our study was a prelude to performing future determinations of other chemokines and their receptors. Thirdly, a restriction of our study was due to the relatively small size of the study groups. In order to completely confirm the results obtained by our team, it is necessary to carry out determinations in a larger number of samples and to introduce additional control groups such as women with breast cysts which are histologically different from *fibroadenoma* lesions, as well as to carry out the same tests among women of premenopausal status. The final limitation of our work is the lack of post-operative evaluation of the tested parameters' concentrations, which is a direct result of the too sparse amount of post-operative material obtained (also as a result of the COVID-19 pandemic) to reliably assess the occurring changes. Despite significant limitations, we believe that our findings bring important information about the dynamics of CXCL12 and CXCR4 in early-stage BC of the most common receptor subtype.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72:7–33.
2. GBD 2019 Cancer Risk Factors Collaborators. The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *Lancet.* 2022;400:563–591.
3. Motyka J, Gacuta E, Kicman A, et al. Plasma levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and chemokine 8 (CXCL8) as diagnostic biomarkers in luminal A and B breast cancer. *J Clin Med.* 2022;11:6694.
4. Arnold M, Morgan E, Rungay H, et al. Current and future burden of breast cancer: global statistics for 2020 and 2040. *Breast.* 2022;66:15–23.
5. Ginsburg O, Yip CH, Brooks A, et al. Breast cancer early detection: a phased approach to implementation. *Cancer.* 2020;126:2379–2393.
6. Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta.* 2010;411:1869–1874.
7. Piskór BM, Przyłipiak A, Dąbrowska E, et al. Plasma level of MMP-10 may be a prognostic marker in early stages of breast cancer. *J Clin Med.* 2020;9:4122.
8. Wang H, Yang X. Association between serum cytokines and progression of breast cancer in Chinese population. *Medicine.* 2017;96:e8840.
9. Dąbrowska E, Przyłipiak A, Zajkowska M, et al. C-C motif chemokine ligand 5 and C-C chemokine receptor type 5: possible diagnostic application in breast cancer patients. *Acta Biochim Pol.* 2020;67:539.
10. Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H, Cancer-Epidemiology B. Classification, pathogenesis and treatment (review of literature). *Cancers.* 2022;14:2569.
11. Danforth DN. The role of chronic inflammation in the development of breast cancer. *Cancers.* 2021;13:3918.
12. Han Y, Mao F, Wu Y, et al. Prognostic role of C-reactive protein in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers.* 2011;26:209–215.
13. Shi Y, Riese DJ 2nd, Shen J. The role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis in cancer. *Front Pharmacol.* 2020;11:574667.
14. Masih M, Agarwal S, Kaur R, et al. Role of chemokines in breast cancer. *Cytokine.* 2022;155:155909.
15. Sun Y, Mao X, Fan C, et al. CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. *Tumour Biol.* 2014;35:7765–7773.
16. Zielińska KA, Katanaev VL. The signaling duo CXCL12 and CXCR4: chemokine fuel for breast cancer tumorigenesis. *Cancers.* 2020;12:3071.
17. D'Alterio C, Giardino A, Scognamiglio G, et al. CXCR4-CXCL12-CXCR7 and PD-1/PD-L1 in pancreatic cancer: CXCL12 predicts survival of radically resected patients. *Cells.* 2022;11:3340.
18. Łukaszewicz-zajac M, Mroczko B, Kozłowski M, et al. The serum concentrations of chemokine CXCL12 and its specific receptor CXCR4 in patients with esophageal cancer. *Dis Markers.* 2016;2016:7963895.
19. Dąbrowska E, Przyłipiak A, Zajkowska M, et al. Possible diagnostic application of CXCL12 and CXCR4 as tumor markers in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 2020;40:3221–3229.
20. Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, et al. UALCAN: an update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia.* 2022;25:18–27.
21. Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia.* 2017;19:649–658.
22. Hozhabri H, Moghaddam MM, Moghaddam MM, et al. A comprehensive bioinformatics analysis to identify potential prognostic biomarkers among CC and CXC chemokines in breast cancer. *Sci Rep.* 2022;12:10374.
23. Chen E, Qin X, Peng K, et al. Identification of potential therapeutic targets among CXC chemokines in breast tumor microenvironment using integrative bioinformatics analysis. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45:1731–1746.
24. Li Y, Liang M, Lin Y, et al. Transcriptional expressions of CXCL9/10/12/13 as prognosis factors in breast cancer. *J Oncol.* 2020;2020:4270957.
25. Mehraj U, Alshehri B, Khan AA, et al. Expression pattern and prognostic significance of chemokines in breast cancer: an integrated bioinformatics analysis. *Clin Breast Cancer.* 2022;22:567–578.
26. Liu H, Li Z, Deng M, et al. Prognostic and clinicopathological value of CXCL12/SDF1 expression in breast cancer: a meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2018;484:72–80.
27. Chuan T, Li T, Yi C. Identification of CXCR4 and CXCL10 as potential predictive biomarkers in Triple Negative Breast Cancer (TNBC). *Med Sci Monit.* 2020;26:e918281.
28. Guo K, Feng G, Yan Q, et al. CXCR4 and CXCR3 are two distinct prognostic biomarkers in breast cancer: database mining for CXCR family members. *Mol Med Rep.* 2019;20:4791–4802.

29. Wu W, Qian L, Chen X, Ding B. Prognostic significance of CXCL12, CXCR4, and CXCR7 in patients with breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:13217–13224.
30. Wu W, Qian L, Dai J, et al. 不同分子分型乳腺癌组织中趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4 和 CXCR7 的表达及临床意义 [Expression of chemokine CXCL12 and its receptor (CXCR4 and CXCR7) in different molecular subtypes of human breast carcinoma and the clinical significance]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2017;42:147–153. Chinese.
31. Pan H, Peng Z, Lin J, et al. Forkhead box C1 boosts triple-negative breast cancer metastasis through activating the transcription of chemokine receptor-4. *Cancer Sci.* 2018;109:3794–3804.
32. Ahirwar DK, Nasser MW, Ouseph MM, et al. Fibroblast-derived CXCL12 promotes breast cancer metastasis by facilitating tumor cell intravasation. *Oncogene.* 2018;37:4428–4442.
33. Helbig G, Christopherson KW, Bhat-Nakshatri P, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem.* 2003;278:21631–21638.
34. Pasquier J, Abu-Kaoud N, Abdesselem H, et al. SDF-1alpha concentration dependent modulation of RhoA and Rac1 modifies breast cancer and stromal cells interaction. *BMC Cancer.* 2015;15:569.
35. Masuda T, Endo M, Yamamoto Y, et al. ANGPTL2 increases bone metastasis of breast cancer cells through enhancing CXCR4 signaling. *Sci Rep.* 2015;5:9170.
36. Seoane S, Martinez-Ordoñez A, Eiro N, et al. POU1F1 transcription factor promotes breast cancer metastasis via recruitment and polarization of macrophages. *J Pathol.* 2019;249:381–394.
37. Zhou W, Guo S, Liu M, et al. Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy. *Curr Med Chem.* 2019;26:3026–3041.
38. Schrader AJ, Lechner O, Templin M, et al. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer.* 2002;86:1250–1256.
39. Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, et al. Expression of CXCL12 and its receptor CXCR4 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2009;21:65–71.
40. Machelon V, Gaudin F, Camilleri-Broët S, et al. CXCL12 expression by healthy and malignant ovarian epithelial cells. *BMC Cancer.* 2011;11:97.
41. Mirisola V, Zuccarino A, Bachmeier BE, et al. CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival. *Eur J Cancer.* 2009;45:2579–2587.
42. Frayyeh A, Salman E, Melconian A. Elevated serum level of CXCR4 in breast cancer women. *Res J Pharm Technol.* 2019;12:3833.

Cancer Management and Research

Dovepress

Publish your work in this journal

Cancer Management and Research is an international, peer-reviewed open access journal focusing on cancer research and the optimal use of preventative and integrated treatment interventions to achieve improved outcomes, enhanced survival and quality of life for the cancer patient. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/cancer-management-and-research-journal>

Rozdział 11.
Zgoda Komisji Bioetycznej

**KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07, fax 85 748 55 08
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 25.02.2021 r.

Uchwała nr: APK.002.104.2021

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U z 2020, poz. 514 ze zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Wybrane cytokiny, chemokiny i ich receptory, metaloproteinazy (MMPs) oraz ich inhibitory (TIMPs) jako markery nowotworów narządu rodnego oraz raka piersi” przez prof. dr hab. Sławomira Ławickiego wraz z zespołem badawczym z UMB we współpracy z zespołem badawczym z Białostockiego Centrum Onkologii.

Planowany okres realizacji od 25.02.2021 r. do 29.02.2024 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

Pouczenie:

1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:

1) wnioskodawca;

2) kierownik podmiotu, w którym eksperymencie medycznym ma być przeprowadzony;

3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.

2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.

Białystok, 26-02-2015

Uchwała nr: R-I-002/51/2015

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Wybrane chemokiny, cytokiny, metaloproteinazy i ich inhibitory oraz molekularne biomarkery karcynogenezy jako markery wczesnego raka piersi” przez dr hab. Sławomira Ławickiego wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej UMB


Prof. dr hab. Elżbieta Hassman-Poznańska

Rozdział 12.
Oświadczenia autora rozprawy doktorskiej

Białystok, 23.08.2023r.

mgr Joanna Motyka
Imiona i nazwisko autora

**Zakład Medycyny Populacyjnej
i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**
Miejsce pracy/afiliacja

Oświadczenie autora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Ławicki P, Ławicki S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. J Clin Med. 2022;11(22):6694. doi:10.3390/jcm11226694*

wchodzącej w skład mojej rozprawy doktorskiej polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, zebraniu i analizie treści merytorycznych, przeprowadzeniu oznaczeń stężeń badanych związków metodą ELISA oraz CMIA, pozyskiwaniu funduszy na przeprowadzenie badań, walidacji wyników, przeprowadzeniu analizy statystycznej, utworzenia manuskryptu pracy, wizualizacji treści i wyników badań oraz korektę manuskryptu, co określam jako 70% udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Malinowski P, Ławicki S. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer. Cancer Manag Res. 2023;15:573-589. doi:10.2147/CMAR.S416382*

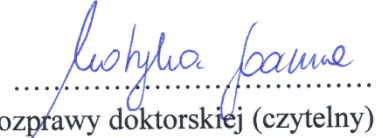
wchodzącej w skład mojej rozprawy doktorskiej polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, zebraniu i analizie treści merytorycznych, przeprowadzeniu oznaczeń stężeń badanych związków metodą ELISA oraz CMIA, pozyskiwaniu funduszy na przeprowadzenie badań, walidacji wyników, przeprowadzeniu analizy statystycznej, utworzenia manuskryptu pracy, wizualizacji treści i wyników badań oraz korektę manuskryptu, co określam jako 70% udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

3. *Motyka J, Kicman A, Kulesza M, Ławicki S. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients. Cancers (Basel). 2023;15(12):3118. Published 2023 Jun 8. doi:10.3390/cancers15123118*

wchodzącej w skład mojej rozprawy doktorskiej polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, zebraniu i analizie treści merytorycznych, utworzenia manuskryptu pracy, wizualizacji treści

oraz korektę manuskryptu, co określam jako 85% udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

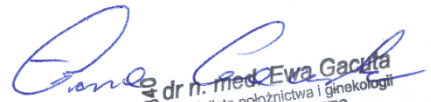
19189
mgr Joanna Motyka
diagnosta laboratoryjny



Podpis autora rozprawy doktorskiej (czytelny)



Podpis promotora (czytelny)



Podpis promotora pomocniczego (czytelny)

**W przypadku każdej z włączonych do cyklu prac zaleca się złożenie oświadczenia przez autora wskazujące na jego merytoryczny oraz procentowy wkład w powstanie pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie danych, wykonanie zestawień statystycznych itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu autora powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej z prac.*

Rozdział 13.
Oświadczenia współautora rozprawy doktorskiej

prof. dr hab. Sławomir Ławicki
imię i nazwisko współautora

Białystok, 28.08.2023
miejsowość, data

**Zakład Medycyny Populacyjnej
i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**
Miejsce pracy/afiliacja

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Ławicki P, Ławicki S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. J Clin Med. 2022;11(22):6694. doi:10.3390/jcm11226694*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w współtworzeniu koncepcji pracy, recenzji i korekcie manuskryptu, pozyskiwaniu środków finansowych oraz nadzorze nad powstawaniem pracy.

2. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Malinowski P, Ławicki S. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer. Cancer Manag Res. 2023;15:573-589. doi:10.2147/CMAR.S416382*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w współtworzeniu koncepcji pracy, nadzorze nad projektem oraz danymi, pozyskiwaniu środków, korekcie manuskryptu oraz walidacją wyników.

3. *Motyka J, Kicman A, Kulesza M, Ławicki S. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients. Cancers (Basel). 2023;15(12):3118. Published 2023 Jun 8. doi:10.3390/cancers15123118*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w współtworzeniu koncepcji pracy, nadzorze nad projektem, recenzji i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Joannę Motyka publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Podpis czytelny



mgr Aleksandra Kicman
imię i nazwisko współautora

Białystok, 23.08.2023r.
miejsowość, data

Zakład Medycyny Estetycznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Miejsce pracy/afiliacja

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Ławicki P, Ławicki S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. J Clin Med. 2022;11(22):6694. doi:10.3390/jcm11226694*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej wchodzący w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w wyszukiwaniu treści merytorycznych, pozyskiwaniu środków, recenzji i korekcie manuskryptu.

2. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Malinowski P, Ławicki S. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer. Cancer Manag Res. 2023;15:573-589. doi:10.2147/CMAR.S416382*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej wchodzący w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w wyszukiwaniu treści merytorycznych, pozyskiwaniu środków, recenzji i korekcie manuskryptu.

3. *Motyka J, Kicman A, Kulesza M, Ławicki S. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients. Cancers (Basel). 2023;15(12):3118. Published 2023 Jun 8. doi:10.3390/cancers15123118*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej wchodzący w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w współtworzeniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Joannę Motyka publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

A. KICMAN
Podpis czytelny
mgr Aleksandra Kicman
diagnosta laboratoryjny

19089

mgr Monika Kulesza
imię i nazwisko współautora

Białystok, 24-08-23 r.
miejsowość, data

**Zakład Medycyny Populacyjnej
i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**
Miejsce pracy/afiliacja

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Ławicki P, Ławicki S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. J Clin Med. 2022;11(22):6694. doi:10.3390/jcm11226694*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w wyszukiwaniu treści merytorycznych, pozyskiwaniu środków oraz korekcie manuskryptu.

2. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Malinowski P, Ławicki S. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer. Cancer Manag Res. 2023;15:573-589. doi:10.2147/CMAR.S416382*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w wyszukiwaniu treści merytorycznych, pozyskiwaniu środków oraz korekcie manuskryptu.

3. *Motyka J, Kicman A, Kulesza M, Ławicki S. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients. Cancers (Basel). 2023;15(12):3118. Published 2023 Jun 8. doi:10.3390/cancers15123118*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w recenzji oraz korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Joannę Motyka publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Podpis czytelny
mgr Monika Kulesza
diagnosta laboratoryjny

18881

dr Ewa Gacuta
imię i nazwisko współautora

Białystok,
miejsowość, data

24.09.23.

**Klinika Perinatologii i Położnictwa ze Szkołą Rodzenia
Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Białymstoku**
Miejsce pracy/afiliacja

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Malinowski P, Ławicki S. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer. Cancer Manag Res. 2023;15:573-589. doi:10.2147/CMAR.S416382*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na zarządzaniu danymi, nadzorze nad oznaczeniami i powstawaniem pracy, walidacji wyników, recenzji i korekcie manuskryptu.

2. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Ławicki P, Ławicki S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. J Clin Med. 2022;11(22):6694. doi:10.3390/jcm11226694*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na zarządzaniu danymi, nadzorze nad oznaczeniami i powstawaniem pracy, walidacji wyników, recenzji i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Joannę Motyka publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

1753840
dr n. med. Ewa Gacuta
Specjalista położnictwa i ginekologii
tel. 664 499 778

Podpis czytelny

Paweł Ławicki
imię i nazwisko współautora

Białystok, 28.08.2023
miejsowość, data

**Zakład Medycyny Populacyjnej
i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**
Miejsce pracy/afiliacja

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Ławicki P, Ławicki S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. J Clin Med. 2022;11(22):6694. doi:10.3390/jcm11226694*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w wizualizacji oraz korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Joannę Motyka publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Podpis czytelny

dr Paweł Malinowski
imię i nazwisko współautora

Białystok, 23.08.2023
miejsowość, data

**Pododdział Chirurgii Piersi i Rekonstrukcji
Białostockie Centrum Onkologii im. Marii
Sklodowskiej-Curie w Białymstoku**
Miejsce pracy/afiliacja

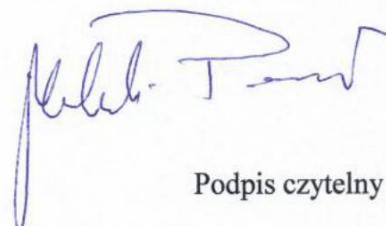
Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Motyka J, Gacuta E, Kicman A, Kulesza M, Malinowski P, Ławicki S. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer. Cancer Manag Res. 2023;15:573-589. doi:10.2147/CMAR.S416382*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Motyka polegał na udziale w zebraniu materiału do badań, ocenie merytorycznej pracy, recenzji oraz korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Joannę Motyka publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Podpis czytelny

dr n. med. Paweł Malinowski
specjalista chirurgii ogólniej
i onkologicznej
23.10.31

Rozdział 14.

Dorobek naukowy

14.1. Wykaz publikacji stanowiących Rozprawę doktorską

1. Motyka, J.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Ławicki, S. CXC ELR-Positive Chemokines as Diagnostic and Prognostic Markers for Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. **2023**, *15*, 3118, doi:10.3390/cancers15123118. IF=**5.200**, MEiN=**200 pkt**.
2. Motyka, J.; Gacuta, E.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Ławicki, P.; Ławicki, S. Plasma Levels of CXC Motif Chemokine 1 (CXCL1) and Chemokine 8 (CXCL8) as Diagnostic Biomarkers in Luminal A and B Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, doi:10.3390/jcm11226694. IF=**3.900**, MEiN=**140 pkt**.
3. Motyka, J.; Gacuta, E.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Malinowski, P.; Ławicki, S. CXCL12 and CXCR4 as Potential Early Biomarkers for Luminal A and Luminal B Subtypes of Breast Cancer. *Cancer Manag. Res.* **2023**, *Volume 15*, 573–589, doi:10.2147/CMAR.S416382. IF=**3.300**, MEiN=**140 pkt**.

14.2. Wykaz innych publikacji naukowych

14.2.1. W czasopismach posiadających nadany IF:

1. Ławicki, P.; Malinowski, P.; Motyka, J.; Ławicki, M.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Gacuta, E.; Guszczyn, T.; Januszkiewicz, M.; Zbucka-Krętowska, M.; et al. Plasma Levels of Metalloproteinase 3 (MMP-3) and Metalloproteinase 7 (MMP-7) as New Candidates for Tumor Biomarkers in Diagnostic of Breast Cancer Patients. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 20 pp., doi:10.3390/jcm12072618. IF=**3.900**, MEiN=**140 pkt**.
2. Charkiewicz, A.; Garley, M.; Ratajczak-Wrona, W.; Jabłońska, E.; Milyk, W.; Motyka, J.; Omeljaniuk, W. The Diagnostic Potential of Novel Biomarkers of Hypertension in Men. *Arch. Med. Sci.* **2022**, *18*, s. 1666-1671, doi:10.5114/aoms/153500. IF=**3.800**, MEiN=**100 pkt**.
3. Kicman, A.; Niczyporuk, M.; Kulesza, M.; Motyka, J.; Ławicki, S. Utility of Matrix Metalloproteinases in the Diagnosis, Monitoring and Prognosis of Ovarian Cancer Patients. *Cancer Manag. Res.* **2022**, *Volume 14*, 3359–3382, doi:10.2147/CMAR.S385658. IF=**3.300**, MEiN=**140 pkt**.
4. Sawicka-Śmiarowska, E.; Bondarczuk, K.; Bauer, W.; Niemira, M.; Szalkowska, A.; Raczkowska, J.; Kwaśniewski, M.; Tarasiuk, E.; Dubatówka, M.; Łapińska, M.; et al. Gut Microbiome in Chronic Coronary Syndrome Patients. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 21 pp., doi:10.3390/jcm10215074. IF=**4.964**, MEiN=**140 pkt**.
5. Będkowska, E.G.; Gacuta, E.; Zbucka-Krętowska, M.; Ławicki, P.; Szmitkowski, M.; Lemancewicz, A.; Motyka, J.; Kobus, A.; Chorąży, M.; Paniczko, M.; et al. Plasma Levels and Diagnostic Utility of VEGF in a Three-Year Follow-up of Patients with Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 17 pp., doi:10.3390/jcm10225452. IF=**4.964**, MEiN=**140 pkt**.

14.2.2. W czasopiśmie i wydawnictwach nieposiadających nadanego IF:

1. Kicman, A.; Kołos, J.; Motyka, J.; Kulesza, M.; Niczyporuk, M.; Szmitkowski, M.; Ławicki, S. The Utility of Metalloproteinase 9 (MMP-9) in Diagnostics of Ovarian Cancer. *Diagnostyka Lab.* **2021**, 57, s. 179-187, doi:10.5604/01.3001.0015.8844. IF= –, MEiN=**40 pkt.**

14.3. Wykaz rozdziałów w monografii:

1. Motyka, J.; Gacuta, E.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Malinowski, P.; Ławicki, S. CXCL8 Jako Marker Diagnostyczno-Prognostyczny Raka Piersi. In *Współczesne problemy medyczne - zagadnienia diagnostyczne i terapeutyczne*. Red. Łukasz B. Pilarz. Lublin, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, 2023.; Wydawnictwo Naukowe Tygiel: Lublin, 2023; p. s. 34-45. IF= –, MEiN=**20 pkt.**
2. Kicman, A.; Klank-Sokołowska, E.; Niczyporuk, M.; Ławicki, P.; Ławicki, M.; Motyka, J.; Kulesza, M.; Ławicki, S. Przydatność Matrylizyn w Diagnostyce Raka Jajnika. In *Współczesne problemy medyczne - zagadnienia diagnostyczne i terapeutyczne*. Red. Łukasz B. Pilarz. Lublin, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, 2023.; Wydawnictwo Naukowe Tygiel: Lublin, 2023; p. s. 88-98. IF= –, MEiN=**20 pkt.**
3. Kulesza, M.; Guszczyn, T.; Ławicki, M.; Kicman, A.; Motyka, J.; Ławicki, P.; Ławicki, S. Rola Enzymów z Grupy Metaloproteinaz w Układzie Szkieletowym. In *Współczesne problemy medyczne - zagadnienia diagnostyczne i terapeutyczne*. Red. Łukasz B. Pilarz. Lublin, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, 2023.; Wydawnictwo Naukowe Tygiel: Lublin, 2023; p. s. 140-148. IF= –, MEiN=**20 pkt.**
4. Ławicki, P.; Chlabicz, M. (stud. .; Motyka, J.; Sowa, P.; Chlabicz, M.; Ławicki, S. Ocena Mocy Diagnostycznej Cytokiny VEGF Oraz Metaloproteinazy MMP-9 w Diagnostyce Raka Piersi. In *Wybrane choroby nowotworowe - diagnostyka i leczenie*. Red. Kalbarczyk Kinga, Maciąg Monika.; Wydawnictwo naukowe TYGIEL sp. z o.o.: Lublin, 2021; p. s. 16-25. IF= –, MEiN=**20 pkt.**
5. Chlabicz, M. (stud. .; Ławicki, P.; Motyka, J.; Sowa, P.; Chlabicz, M.; Ławicki, S. Ocena Przydatności MMP-9 Oraz VEGF w Diagnostyce Raka Piersi. In *Wybrane choroby nowotworowe - diagnostyka i leczenie*. Red. Kalbarczyk Kinga, Maciąg Monika.; Wydawnictwo naukowe TYGIEL sp. z o.o.: Lublin, 2021; p. s. 7-15. IF= –, MEiN=**20 pkt.**
6. Motyka, J.; Sibicka, S.; Kicman, A.; Ławicki, P.; Ławicki, S. Znaczenie Chemokiny CXCL12 w Raku Piersi. In *Wybrane choroby nowotworowe - diagnostyka i leczenie*. Red. Kalbarczyk Kinga, Maciąg Monika.; Wydawnictwo naukowe TYGIEL sp. z o.o.: Lublin, 2021; p. s. 43-63. IF= –, MEiN=**20 pkt.**
7. Motyka, J.; Hodun, K.; Ławicki, S. Przydatność MMP-9 Oraz TIMP-1 i TIMP-2 w Diagnostyce Raka Piersi. In *Wybrane zagadnienia z zakresu onkologii i zdrowia człowieka*. Red. Monika Maciąg, Izabela Moldoch-Mendoń.; Wydawnictwo naukowe TYGIEL sp. z o.o.: Lublin, 2020; p. s. 99-109. IF= –, MEiN=**20 pkt.**

14.4. Wykaz doniesień zjazdowych:

1. Ławicki, M.; Ławicki, P.; Kulesza, M.; Motyka, J.; Kicman, A.; Gacuta, E.; Sowa, P. Evaluation of Cytokines M-CSF and VEGF as Tumor Markers in Luminal B HER Negative Subtype of Breast Cancer Patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2023**, *61*, s. S2149. 25th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (WorldLab) and 25th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab), 55th Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology, Roma, Italy, May 21st to 25th, 2023.
2. Kicman, A.; Niczyporuk, M.; Kulesza, M.; Ławicki, M.; Ławicki, P.; Motyka, J.; Gacuta, E.; Klank-Sokołowska, E.; Ławicki, S. MMP-3 Potential Utility as a Marker for Differentiating Serous Ovarian Cancer from Ovarian Cysts. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2023**, *61*, s. S2163. 25th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (WorldLab) and 25th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab), 55th Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology, Roma, Italy, May 21st to 25th, 2023.
3. Ławicki, P.; Ławicki, M.; Kulesza, M.; Motyka, J.; Kicman, A.; Gacuta, E.; Sowa, P. The Plasma Levels and Diagnostic Utility of Cytokines M-CSF and VEGF as a New Biomarkers in Diagnostic of Luminal A Subtype of Breast Cancer Patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2023**, *61*, s. S2148. 25th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (WorldLab) and 25th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab), 55th Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology, Roma, Italy, May 21st to 25th, 2023.
4. Kulesza, M.; Guszczyn, T.; Motyka, J.; Ławicki, M.; Ławicki, P.; Kicman, A.; Gacuta, E.; Ławicki, S. The Plasma Levels of Chemokine CCL5 as Tumor Marker of Breast Cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2023**, *61*, s. S2162. 25th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (WorldLab) and 25th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab), 55th Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology, Roma, Italy, May 21st to 25th, 2023.
5. Ławicki, S.; Gacuta, E.; Motyka, J.; Ławicki, M.; Ławicki, P.; Krętowska, M.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Będkowska, E.; Szmitkowski, M. The Utility of Chemokine CCL2 in Diagnostic of Luminal a Subtype of Breast Cancer Patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2023**, *61*, s. S2210. 25th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (WorldLab) and 25th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab), 55th Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology, Roma, Italy, May 21st to 25th, 2023.
6. Będkowska, E.G.; Gacuta, E.; Ławicki, S.; Motyka, J.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Pańkowska, K.; Ławicki, P.; Chlabicz, M. (stud. .; Dąbrowska, M. CCL2 and CCL5 as New Markers of Early-Stage Endometrial Cancer. *Clin. Chim. Acta* **2022**, *530*, s. S70-S71. 24th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - IFCC WorldLab SEOUL 2022. 16th Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry - 16th APFCB. Seoul, Korea, 26-30 June 2022.
7. Motyka, J.; Kulesza, M.; Kicman, A.; Będkowska, E.G.; Ławicki, S.; Ławicki, P.

-
- Evaluation of Chemokine CXCL1, CXCL12 and Metalloproteinase MMP-9 as Diagnostic Markers of Breast Cancer. *Clin. Chim. Acta* **2022**, 530, s. S69. 24th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - IFCC WorldLab SEOUL 2022. 16th Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry - 16th APFCB. Seoul, Korea, 26-30 June 2022.
8. Ławicki, P.; Będkowska, E.G.; Gacuta, E.; Motyka, J.; Kulesza, M.; Kicman, A.; Chlabicz, M. (stud. .; Sowa, P. Evaluation of Cytokines M-CSF, VEGF and Metalloproteinase MMP-9 as Diagnostic Markers of Ovarian Cancer. *Clin. Chim. Acta* **2022**, 530, s. S70. 24th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - IFCC WorldLab SEOUL 2022. 16th Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry - 16th APFCB. Seoul, Korea, 26-30 June 2022.
 9. Kulesza, M.; Motyka, J.; Kicman, A.; Będkowska, E.G.; Ławicki, S.; Guszczyn, T.; Ławicki, P. Evaluation of the Concentration and Diagnostic Utility of Matrylysins (MMP-7 and MMP-26) in the Diagnosis of Endometrial Cancer. *Clin. Chim. Acta* **2022**, 530, s. S69-S70. 24th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - IFCC WorldLab SEOUL 2022. 16th Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry - 16th APFCB. Seoul, Korea, 26-30 June 2022.
 10. Chlabicz, M.; Jamiołkowski, J.; Szum-Jakubowska, A.; Sowa, P.; Dubatówka, M.; Łapińska, M.; Kondraciuk, M.; Motyka, J.; Chlabicz, M. (stud. .; Szpakowicz, A.; et al. Has the SARS-COV-2 Pandemic Affected Cardiovascular Risk Parameters in the General Population? *Clin. Chim. Acta* **2022**, 530, s. S96, doi:10.1016/j.cca.2022.04.569. 24th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - IFCC WorldLab SEOUL 2022. 16th Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry - 16th APFCB. Seoul, Korea, 26-30 June 2022.
 11. Ławicki, S.; Gacuta, E.; Głazewska, K.; Motyka, J.; Ławicki, P.; Będkowska, E.G. The Plasma Levels and Diagnostic Utility of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Metalloproteinase 9 (MMP-9) before and after Surgery of Breast Cancer Patients. *Clin. Chim. Acta* **2022**, 530, s. S59-S60. 24th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - IFCC WorldLab SEOUL 2022. 16th Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry - 16th APFCB. Seoul, Korea, 26-30 June 2022.
 12. Chlabicz, M. (stud. .; Ławicki, P.; Chlabicz, M.; Ławicki, S.; Gacuta, E.; Motyka, J.; Będkowska, E.; Sowa, P. Diagnostic Utility of MMP-2 and MMP-9 before and after Surgery of Breast Cancer Patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2021**, 59, s. 206. 24th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Munich, Nov 28-Dec 02, 2021
 13. Motyka, J.; Kicman, A.; Ławicki, S.; Będkowska, E.; Ławicki, P. Plasma Level and Diagnostic Utility of Chemokine CXCL8 in Breast Cancer Patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2021**, 59, s. 216. 24th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Munich, Nov 28-Dec 02, 2021
 14. Kicman, A.; Motyka, J.; Ławicki, S.; Niczyporuk, M.; Będkowska, E.; Ławicki, P. Plasma Levels and Diagnostic Utility of Galectin-3 in Patients with Endometrial Cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2021**, 59, s. 213. 24th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Munich, Nov 28-Dec 02, 2021
 15. Ławicki, P.; Chlabicz, M. (stud. .; Chlabicz, M.; Gacuta, E.; Ławicki, S.; Motyka, J.;
-

-
- Będkowska, E.; Sowa, P. Plasma Levels and Diagnostic Utility of VEGF in Breast Cancer Patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2021**, *59*, s. 223. 24th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Munich, Nov 28-Dec 02, 2021
16. Będkowska, E.; Ławicki, S.; Pańkowska, K.; Gacuta, E.; Ławicki, P.; Szmitkowski, M.; Motyka, J.; Dąbrowska, M. The Diagnostic Utility of Selected Chemokines CCL2 and CCL5 in Ovarian Cancer Patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2021**, *59*, s. 224. 24th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Munich, Nov 28-Dec 02, 2021
17. Motyka, J.; Malinowski, P. [Onkol. .; Kicman, A.; Ławicki, M.; Ławicki, P.; Kulesza, M.; Gacuta, E.; Ławicki, S. Preliminary Study of CXCR1 and CA 15-3 Plasma Levels as Diagnostic Markers of Early-Stages Luminal Subtypes of Breast Cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2023**, *61*, s. S2164. 25th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (WorldLab) and 25th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab), 55th Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology, Roma, Italy, May 21st to 25th, 2023.
18. Motyka, J.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Ławicki, S. Ocena Chemokiny CXCL8 Jako Osoczonego Markera Różnicującego Estrogenozależnego Raka Piersi w I Stadium Zaawansowania Od Zmian Łagodnych Fibroadenoma. *XV Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2023 Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju; Lublin, Polska, 23-26 marca 2023 r.*
19. Ławicki, S.; Gacuta, E.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Motyka, J.; Szmitkowski, M. Ocena Stężenia i Przydatności Diagnostycznej Metaloproteiny 7. (MMP-7) w Osoczu Chorych z Podtypem Luminalnym B Raka Piersi. *Diagnostyka Lab.* **2022**, *58*, s. 96. Polskie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej : Kielce, 2022.10.19-22.
20. Motyka, J.; Hodun, K.; Ławicki, S. Rola Chemokiny CXCL8 w Raku Piersi. In *XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2021. Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju.; Lublin, Polska, 25-28 marca 2021.*
21. Motyka, J.; Hodun, K.; Ławicki, S. Ocena Stężeń i Przydatności Diagnostycznej MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 w Raku Piersi. In *XII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2020. Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju; Lublin, Polska, 24-27 września 2020.*
22. Kulesza, M.; Ławicki, M.; Motyka, J.; Kicman, A.; Guszczyn, T.; Ławicki, S. Ocena Skuteczności Terapii Preparatem PRP u Chłopców Za Pomocą Skali Lysholm w Chorobie Osgood-Schlattera. In *IX Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP, Lublin, Polska, 3 grudnia 2022.*
23. Ławicki, M.; Ławicki, P.; Kicman, A.; Kulesza, M.; Motyka, J.; Ławicki, S.; Sowa, P. Ocena Stężenia i Przydatności Diagnostycznej VEGF w Osoczu Chorych z Podtypem Luminalnym B Raka Piersi. In *IX Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP, Lublin, Polska, 3 grudnia 2022.*
24. Motyka, J.; Ławicki, M.; Malinowski, P. (in); Kicman, A.; Kulesza, M.; Ławicki, S. Wstępne Badania Stężenia i Przydatności Diagnostycznej Receptora Chemokin CXCR2 Jako Wczesnego Markera Nowotworowego Raka Piersi. In *IX Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP, Lublin, Polska, 3 grudnia 2022.*
25. Kicman, A.; Motyka, J.; Ławicki, M.; Kulesza, M.; Klank-Sokołowska, E.; Knapp, P.;
-

-
- Niczyporuk, M.; Ławicki, S. Znaczenie Diagnostyczne MMP-26 u Chorych Na Raka Jajnika. In *IX Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP, Lublin, Polska, 3 grudnia 2022.*
26. Kulesza, M.; Motyka, J.; Sowa, P. Przydatność Diagnostyczna Wybranych Metaloproteinaz (MMP-2 Oraz MMP-9) w Raku Piersi. In *VII Ogólnopolska Konferencja Studentów Medycyny Laboratoryjnej i Młodych Diagnostów Wschodząca Diagnostyka, Białystok, Polska, 5 czerwca 2021.*
27. Hodun, K.; Motyka, J.; Baranowski, M. Hipoksja Hamuje Wzrost Stężenia Sfingozyno-1-Fosforanu w Osoczu Indukowany Wysiłkiem. In *XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2021. Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju.; Lublin, Polska, 25-28 marca 2021.*
28. Ławicki, P.; Chlabicz, M. (stud. .; Motyka, J.; Chlabicz, M.; Sowa, P. Ocena Przydatności Diagnostycznej Cytokiny M-CSF Jako Nowego Markera Raka Jajnika. In *XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2021. Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju.; Lublin, Polska, 25-28 marca 2021.*
29. Chlabicz, M. (stud. .; Ławicki, P.; Motyka, J.; Chlabicz, M.; Sowa, P. Przydatność VEGF w Diagnostyce Chorych Na Raka Jajnika. In *XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2021. Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju.; Lublin, Polska, 25-28 marca 2021.*

14.5. Wykaz innych aktywności naukowych:

1. Uczestnik projektu nr POWR.07.01.00-00-0002/22 realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 Oś Priorytetowa VIIWsparcie REACT- EU w latach 2022-2023 pn. "Kursy podnoszące kwalifikacje kadry medycznej udzielającej świadczeń zdrowotnych, w tym w związku z chorobą zakaźną, w szczególności COVID-19"
2. Uczestnik projektu nr POWR.03.03.00-00-PN13/18. realizowanego w ramach „Programu PROM – Międzynarodowa wymiana stypendialna doktorantów i kadry akademickiej” zawartej z Narodową Agencją Wymiany Akademickiej współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój.
3. Uczestnik kursów doszkalających przeprowadzanych przez Centrum Medyczne Kształcenia Podplomowego:
 - „Metody immunochemiczne w praktyce laboratoryjnej”, nr kursu 01-708/0-00-038-2020
 - „Wybrane zagadnienia z molekularnych podstaw onkogenezy”, nr kursu 01-708/0-00-028-2020
 - „Przepływ informacji genetycznej od genu do białka”, nr kursu 01-708/0-00-035-2020
 - „Badanie krwinek czerwonych z zastosowaniem cytometrii przepływowej”, nr kursu 01-708/0-00-052-2020
 - „Starzenie się krwinek czerwonych prawidłowych, przechowywanych oraz w patologiach”, nr kursu 01-708/0-00-058-2020

-
- „Rola mikroRNA w procesie nowotworzenia”, nr kursu 01-708/0-00-005-2021
 - „Podstawy techniki immunoenzymatycznej ELISA – kurs praktyczny”, nr kursu 01-708/0-00-026-2021
 - „Wybrane zagadnienia z diagnostyki laboratoryjnej przewlekłych schorzeń jelit”, nr kursu 01-708/0-00-022-2022
 - „Infekcje przewodu pokarmowego”, nr kursu 01-708/0-00-029-2022
 - „Wpływ hormonów tarczycy na otyłość i zaburzenia metaboliczne – aspekty kliniczne i molekularne”, nr kursu 01-741/0-00-020-2022
 - „Badania laboratoryjne a profilaktyka chorób cywilizacyjnych”, nr kursu 01-708/0-00-032-2022
 - „Rak nerki: wybrane zagadnienia kliniczne i molekularne”, nr kursu 01-754/0-00-015-2022
 - „Hormony tarczycy: wybrane zagadnienia kliniczne i molekularne”, nr kursu 01-741/0-00-019-2022
 - „Rola mikrobiomu w patogenezie i rozwoju wybranych chorób człowieka”, nr kursu 01-708/0-00-041-2022