



## Ocena znaczenia białka YKL-40 jako biomarkera w raku jelita grubego oraz jego powiązań z wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi

### Assessment of importance of YKL-40 protein as biomarker in colorectal cancer and its relation to selected clinical and pathological parameters

Dorota Nadbrzeźna-Barczyk<sup>1</sup>, Dariusz Waniczek<sup>2</sup> , Elżbieta Świętochowska<sup>3</sup> , Ewa Nowakowska-Zajdel<sup>4</sup> ,  
Angelika Copija<sup>4</sup> , Aleksandra Raźnikiewicz<sup>5</sup>, Monika Rykaczewska-Czerwińska<sup>6</sup> , Zbigniew Lorenc<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej, Kolorektalnej i Urazów Wielonarządowych, Wydział Nauk o Zdrowiu w Katowicach,  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>2</sup>Zakład Pielęgniarstwa Chirurgicznego i Propedeutyki Chirurgii, Wydział Nauk o Zdrowiu w Katowicach,  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Biologii Medycznej i Molekularnej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze,  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>4</sup>Zakład Profilaktyki Chorób Żywnościowo-zależnych, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu,  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>5</sup>Klinika Chirurgii Wad Rozwojowych Dzieci i Traumatologii, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze,  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>6</sup>Zakład Farmakologii Klinicznej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

#### STRESZCZENIE

**WSTĘP:** Rak jelita grubego (*colorectal cancer* – CRC) jest jednym z najczęstszych nowotworów na świecie – odpowiada za 10% rocznej globalnej zapadalności na raka. Przez długi czas może pozostać bezobjawowy i mimo postępu medycyny zbyt często zostaje zdiagnozowany za późno. Białko YKL-40 jest czynnikiem wzrostu stymulującym migrację komórek śródbłonna, odgrywającym rolę w stanach zapalnych oraz nowotworowych. Celem pracy była ocena znaczenia YKL-40 jako biomarkera w CRC oraz określenie powiązań stężeń YKL-40 w surowicy u chorych na CRC z wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi.

**MATERIAŁ I METODY:** W badaniu prospektywnym, obejmującym 133 osoby powyżej 50 roku życia, oznaczono stężenie białka YKL-40 w surowicy metodą ELISA. Pacjentów podzielono na dwie grupy: 91 osób chorujących na CRC oraz 42 osoby zdrowe. W analizie statystycznej wykorzystano testy t-Studenta dla danych niezależnych, U Manna-Whitneya i regresję logistyczną.

Received: 08.06.2020

Revised: 30.04.2021

Accepted: 25.10.2021

Published online: 31.12.2021

Adres do korespondencji: dr hab. n. med. Dariusz Waniczek, Klinika Chirurgii Onkologicznej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Ceglana 35, 40-514 Katowice, tel. +48 500 835 519, e-mail: dwaniczek@sum.edu.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
www.annales.sum.edu.pl



**WYNIKI:** Stężenie YKL-40 w surowicy było znacznie wyższe u chorych na CRC ( $163 \pm 36 \mu\text{g/l}$ ) niż u osób zdrowych ( $54 \pm 20 \mu\text{g/l}$ ;  $p < 0,0001$ ). U osób z CRC nie wykazano zależności między parametrami klinicznymi, tj. płcią, wiekiem i wskaźnikiem masy ciała (*body mass index* – BMI), a stężeniem białka YKL-40 w surowicy. U chorych z CRC stężenie YKL-40 w surowicy statystycznie istotnie różniło się we wczesnym i średniozaawansowanym stadium nowotworowym.

**WNIOSKI:** Białko YKL-40 wydaje się obiecującym biomarkerem CRC. Jego stężenie w surowicy jest skorelowane ze stopniem zaawansowania nowotworu zależnie od głębokości nacieku w stosunku do błony podśluzowej i może być czynnikiem rokowniczo niepomyślnym dla tego nowotworu.

#### SŁOWA KLUCZOWE

rak jelita grubego, YKL-40, lokalizacja raka okrężnicy, biomarker nowotworowy

### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers in the world, accounting for 10% of the annual global cancer incidence. This malignant neoplasm can remain asymptomatic for a long time and, despite medical advances, is too frequently diagnosed too late. The YKL-40 protein is a growth factor that stimulates endothelial cell migration, and plays a role in inflammation and neoplasia. The aim of the study was to assess the significance of YKL-40 as a biomarker in CRC and to determine the correlation between the serum YKL-40 levels in CRC patients and selected clinical and pathological parameters.

**MATERIAL AND METHODS:** In a prospective study involving 133 patients over the age of 50, the serum YKL-40 protein level concentration was determined by the ELISA method. The patients were divided into two groups: 91 with CRC and 42 healthy. For the statistical analysis Student's t-test for independent data, the Mann-Whitney U test, and logistics regression were used.

**RESULTS:** The YKL-40 serum concentration was significantly higher in the CRC patients ( $163 \pm 36 \mu\text{g/l}$ ) than the healthy patients ( $54 \pm 20 \mu\text{g/l}$ ;  $p < 0.0001$ ). There was a statistically significant difference in the serum YKL-40 concentration between the early and intermediate stages of CRC. There was no correlation between the clinical parameters, i.e. sex, age and BMI and the serum YKL-40 protein concentration in the people with CRC.

**CONCLUSIONS:** The YKL-40 protein seems to be a promising CRC biomarker. Its serum concentration is correlated with the stage of the cancer depending on the depth of the growth relative to the submucosa and may be a prognostic factor for an adverse prognosis of this cancer.

#### KEY WORDS

colorectal cancer, YKL-40, colon cancer localization, cancer biomarker

### WPROWADZENIE

Rak jelita grubego (*colorectal cancer* – CRC) stanowi poważny problem zdrowia publicznego z uwagi na częstość występowania (1,8 miliona nowych zachorowań w 2018 r.) i powodowaną stosunkowo wysoką umieralność (8% zgonów nowotworowych na świecie). To jeden z najczęstszych nowotworów złośliwych na świecie – trzeci u mężczyzn (11,4%) i drugi u kobiet (9,7%) [1,2]. W około 90–95% przypadków pojawia się po 50 roku życia; częstość występowania CRC u mężczyzn i kobiet jest porównywalna [2,3]. Odsetek przeżyć 5-letnich wynosi około 65–70% [4]. Pod względem histopatologicznym 90–95% wszystkich nowotworów złośliwych jelita grubego stanowi gruczolakorak (*adenocarcinoma*) [5]. Wykazano, iż badania przesiewowe mogą zmniejszyć śmiertelność związaną z CRC o około 15%. Aktualnie opierają się one jedynie na kolonoskopii oraz/lub analizie próbek kału, uważanych za badania nieprzyjemne dla pacjentów; w przypadku badań endoskopowych problemem jest

### INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is a major public health problem due to its prevalence (1.8 million new cases in 2018) and relatively high mortality rate (8% of cancer deaths worldwide). It is one of the most common malignancies worldwide – third in men (11.4%) and second in women (9.7%) [1,2]. Approximately 90–95% of cases occur after the age of 50, while the incidence of CRC in men and women is comparable [2,3]. The five-year survival rate is approximately 65–70% [4]. Histopathologically, 90–95% of all colorectal malignancies are adenocarcinomas [5]. Screening has been shown to reduce CRC-related mortality by approximately 15%. Currently, screening for CRC is based solely on colonoscopy and/or stool sample analysis, which are considered to be unpleasant for patients and, in the case of endoscopic examination, often difficult to access, expensive, time-consuming, and associated with longer waiting times for their performance [6,7].



często trudna dostępność, kosztowność oraz czasochłonność, wiążące się z dłuższym czasem oczekiwania na ich wykonanie [6,7].

Białko YKL-40, zwane również glikoproteina CHI3L1 (*chitinase-3-like protein 1*), HC gp39 (*human cartilage glycoprotein 39*), gp38k czy chondrex, wytwarzane jest przez makrofagi, chondrocyty, komórki mięśni gładkich naczyń oraz komórki nowotworowe [8]. Zbudowane jest z 383 aminokwasów, a jego masa molowa wynosi około 40 Da [9]. Gen kodujący YKL-40 znajduje się na chromosomie 1q32.1 [10]. Glikoproteina YKL-40 nie wykazuje aktywności enzymatycznej, jednak posiada zdolność wiązania kolagenu typu I, chityny, hialuronianu, a także receptora interleukinowego IL-13R $\alpha$ 2 [11,12]. Do podstawowych funkcji YKL-40 należą m.in. regulacja procesów zapalnych, proliferacji, różnicowania, przeciwdziałanie apoptozie, czy też indukowanie angiogenezy – jednego z najważniejszych procesów wpływających na nowotworzenie [13,14]. Funkcjonowanie CHI3L1 podlega regulacji interleukiny 6 (IL-6), TNF- $\alpha$  oraz NF- $\kappa$ B – czynnika biorącego udział w regulacji proliferacji i apoptozy komórek [15].

W związku z tym, iż dynamika rozwoju CRC jest jedną z najwyższych w Europie, a sama choroba często przebiega bezobjawowo i tylko 10–20% pacjentów jest diagnozowanych we wczesnym stadium, stale i intensywnie poszukuje się nowych algorytmów diagnostycznych dla tego nowotworu. U chorych nowotworowych, w tym z CRC, stężenie YKL-40 w surowicy wzrasta często kilkukrotnie i zmienia się we krwi (na co wpływa m.in. typ raka czy stopień zaawansowania choroby) [16,17], dlatego też ocena stężeń YKL-40 we krwi oraz ich związku z uznanymi parametrami klinicznymi może zaowocować lepszym zrozumieniem ich znaczenia, a tym samym zaproponowaniem nowych algorytmów diagnostycznych i potencjalnych celów terapeutycznych CRC.

Celem pracy była ocena YKL-40 jako biomarkera dla CRC oraz powiązanie jego stężeń w surowicy z wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi, w tym ze stopniem zaawansowania nowotworu.

## MATERIAŁ I METODY

Badanie prospektywne zostało przeprowadzone w latach 2017–2019 i objęło 133 chorych powyżej 50 roku życia. Pacjentów podzielono na dwie grupy, niezależnie od płci. Do grupy badanej zaliczono 91 osób (43 kobiety i 48 mężczyzn; średnia wieku 66,4  $\pm$  10,7 roku) z potwierdzonym w badaniu histopatologicznym gruczolakorakiem jelita grubego. Do grupy kontrolnej włączono 42 osoby zdrowe (23 kobiety i 19 mężczyzn; średnia wieku 65,3  $\pm$  9,7 roku), bez obciążeń chorobowych oraz cech infekcji. Kryteriami włączenia do obu grup było wykluczenie stanów

YKL-40, also called CHI3L1 (*chitinase-3-like protein 1*) glycoprotein, HC gp-39 (*human cartilage glycoprotein 39*), gp-38k, chondrex, is a protein produced by macrophages, chondrocytes, vascular smooth muscle cells, as well as cancer cells [8]. This protein is composed of 383 amino acids and its molar mass is approximately 40 Da [9]. The gene encoding YKL-40 is located on chromosome 1q32.1 [10]. The YKL-40 glycoprotein lacks enzymatic activity but has the ability to bind type I collagen, chitin, hyaluronate, as well as the interleukin receptor IL-13R $\alpha$ 2 [11,12]. The primary functions of YKL-40 include the regulation of inflammation processes, the proliferation, differentiation and prevention of apoptosis as well as the induction of angiogenesis, one of the most important processes affecting carcinogenesis [13,14]. CHI3L1 function is regulated by interleukin 6 (IL-6), TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B, a factor involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis [15].

As the dynamics of the development of CRC is one of the highest in Europe, the disease itself is often asymptomatic and only 10–20% of patients are diagnosed at an early stage, new diagnostic algorithms for this cancer are constantly and intensively sought. In cancer patients, including those with CRC, the serum levels of YKL-40 often increase several times and fluctuate in the blood (i.e. they are influenced by the type of cancer or disease stage, among others) [16,17]. Therefore, the examination of YKL-40 concentrations in the blood and their relationship to recognised clinical parameters may result in a better understanding of their significance and thus in proposing new diagnostic algorithms and potential therapeutic goals for CRC.

The aim of this study was to evaluate YKL-40 as a biomarker for CRC and to relate its serum concentrations to selected clinicopathological parameters, including the stage of the cancer.

## MATERIAL AND METHODS

A prospective study was conducted between 2017 and 2019 and included 133 patients over the age of 50. The patients were divided into two groups, matched regardless of sex. The study group included 91 patients (43 women and 48 men; mean age 66.4  $\pm$  10.7) with histopathologically confirmed colorectal adenocarcinoma. Forty-two healthy subjects (23 women and 19 men; mean age, 65.3  $\pm$  9.7) with no disease burden or features of infection were included in the control group. The inclusion criteria for both groups were the exclusion of life-threatening conditions and written informed consent to participate in the study. In the study group, patients with chronic diseases (except diabetes and hypertension) were



chorobowych zagrażających życiu oraz uzyskanie pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniach. W grupie badanej z badań dyskwalifikowane były osoby obciążone chorobami przewlekłymi (poza cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym). Na badania uzyskano zgodę Komisji Etycznej (Uchwała nr KW/0022/KBI/42/14/16/18).

Analizę grup badanej i kontrolnej przeprowadzono na podstawie wywiadu chorobowego oraz ankiety zawierającej pytania otwarte i zamknięte, których charakterystykę przedstawiono w tabeli I. Stopień zaawansowania wg TNM (TNM – *tumour, node, metastasis* – Classification of Malignant Tumours; posłużyliśmy się obecnie obowiązującą, siódmą klasyfikacją TNM wg American Joint Committee) z klasyfikacją dla poszczególnych stopni zaawansowania klinicznego nowotworu (*clinical stage* – CS) przedstawiono w tabeli II.

U każdej osoby objętej badaniem pobrano krew żylną o objętości 5 ml z żyły pośrodkowej łokcia, po czym materiał odwirowano w celu uzyskania surowicy do dalszego oznaczania białka YKL-40. Probówki przechowywano w temperaturze  $-78^{\circ}\text{C}$ .

excluded from the study. The study was performed with prior approval of the Ethics Committee (Resolution No. KW/0022/KBI/42/14/16/18).

The analysis of the study and control groups was based on patient history and a questionnaire containing open and closed questions, the description of which is presented in Table I. TNM staging (we used the current 7th TNM classification according to the American Joint Committee) with the classification for each clinical stage (CS) of cancer is shown in Table II.

From each subject, 5 ml venous blood was collected from the median vein of the elbow, and the resulting material was centrifuged to obtain serum for further determination of the YKL-40 protein. The test tubes were stored at  $-78^{\circ}\text{C}$ .

### Analytical methods

The serum levels of YKL-40 were determined by ELISA. The analytical procedure was compliant with the provisions set out by the manufacturer in the instruction manual included with the kit. Absorbance readings were taken at 405 nm using a  $\mu\text{Quant}$  reader

**Tabela I.** Cechy kliniczne na podstawie ankiet w grupach badanej i kontrolnej  
**Table I.** Clinical features obtained from questionnaires in study and control groups

Cecha kliniczna/ Clinical feature	Grupa badana/Study group		Grupa kontrolna/Control group		
	liczba osób/ number of persons	śr. $\pm$ od. st./ average $\pm$ SD	liczba osób/ number of persons	śr. $\pm$ od. st./ average $\pm$ SD	p-wartość/ p-value
Wiek (lata)/Age (years)	91	66,4 $\pm$ 10,7	42	65,3 $\pm$ 9,7	0,5880
Płeć (%) / Sex (%)	91	(47 k, 53 m)	42	(55 k, 45 m)	0,4241
kobiety(k)/women					
mężczyźni(m)/men					
Wzrost (cm)/Height (cm)	91	167 $\pm$ 10	42	170 $\pm$ 8	0,2065
Masa ciała (kg)/Body weight (kg)	91	76,1 $\pm$ 16,6	42	73,9 $\pm$ 14,5	0,4539
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	91	27,1 $\pm$ 5,4	42	25,8 $\pm$ 4,2	0,1663
Cukrzyca (%) / Diabetes (%)	91	22	42	7	0,0365
Nadciśnienie tętnicze (%) / Hypertension (%)	91	44	42	33	0,2492
Papierosy (%) / Cigarettes (%)	91	30	42	14	0,0576
Paczkolata/Pack-years	91	7,54 $\pm$ 13,5	42	2,21 $\pm$ 5,66	0,0154



Tabela II. Podział grupy badanej na podstawie stopnia zaawansowania wg TNM oraz CS

Table II. Division of study group according to TNM and CS

CS	Liczba osób/Number of persons
I	7 (7,69%)
II	13 (14,29%)
III	32 (35,16%)
IV	39 (42,86%)

### Metody analityczne

Stężenia YKL-40 w surowicy oznaczono metodą ELISA. Procedura analityczna była zgodna z przepisami producenta w instrukcji technologicznej dołączonej do zestawu. Odczytów absorbancji dokonywano przy długości fali 405 nm z wykorzystaniem czytnika  $\mu$ Quant (BioTek, USA), natomiast obróbkę wyników przeprowadzono z użyciem programu KCJunior (BioTek, USA). Czulość metody wynosiła 8,15 pg/ml, a nieprecyzyjność metody (powtarzalność w serii jednoczesnej) – 5,3% [18].

### Metody statystyczne

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Obliczenia statystyczne zostały wykonane w platformie R [19]. Zbiorcą charakterystykę pacjentów z grup badanej oraz kontrolnej, wraz ze wstępną analizą statystyczną, przeprowadzono z wykorzystaniem testów t-Studenta dla danych niezależnych i U Manna-Whitneya. Następnie posłużono się regresją logistyczną. Istotność statystyczną ustalono dla wartości  $p < 0,02$ .

## WYNIKI

Stężenie YKL-40 w surowicy było zdecydowanie wyższe w grupie badanej ( $163 \pm 36 \mu\text{g/l}$ ) niż w grupie kontrolnej ( $54 \pm 20 \mu\text{g/l}$ ), przy istotności statystycznej  $p < 0,0001$  (tab. III, ryc. 1). U chorych z CRC stężenie YKL-40 w surowicy statystycznie istotnie różniło się we wczesnym i średniozaawansowanym stadium nowotworowym (ryc. 2).

Przeprowadzona analiza zmiennych: BMI (*body mass index*), masy ciała, obecności choroby współistniejącej, wykazała brak istotnych statystycznie korelacji (BMI:  $p = 0,17$ ; masa ciała:  $p = 0,45$ ; nadciśnienie tętnicze:  $p = 0,25$ ). Posługując się regresją logistyczną (określającą w niniejszej pracy, z jakim prawdopodobieństwem białko YKL-40 może przyczynić się do wystąpienia guza w zstępnicy lub jego braku) oraz ilorazem szans (*odds ratio* – OR), wykazano natomiast związek między wyższym stężeniem YKL-40 w surowicy a lokalizacją guza w zstępnicy (OR = 0,97;  $p > 0,02$ ; tab. IV, ryc. 3).

(BioTek, USA), while processing of the results was performed using KCJunior software (BioTek, USA). The sensitivity of the method was 8.15 pg/ml, while the imprecision of the method (repeatability in simultaneous series) was 5.3% [18].

### Statistical methods

The obtained results were analysed in statistical terms. Statistical calculations were performed in the R platform [19]. The cumulative characteristics of the patients from the study and control groups, along with the preliminary statistical analysis, were performed using Student's t-tests for independent data and Mann-Whitney U tests. Subsequently, logistic regression was used. Statistical significance was determined for a  $p$  value  $< 0.02$ .

## RESULTS

The serum concentration of YKL-40 was significantly higher in the study group ( $163 \pm 36 \mu\text{g/l}$ ) than in the control group ( $54 \pm 20 \mu\text{g/l}$ ) with a statistical significance of  $p < 0.0001$  (Table III, Figure 1). In the patients with CRC, the serum YKL-40 levels were statistically significantly different between the early and intermediate stages of cancer (Figure 2).

The analysis of BMI (body mass index), body weight, and the presence of comorbid disease showed no statistically significant correlations (BMI:  $p = 0.17$ ; body weight:  $p = 0.45$ ; hypertension:  $p = 0.25$ ). On the other hand, using logistic regression (used in our study to determine with what probability the YKL-40 protein may or may not contribute to the occurrence or absence of a tumour in the descending colon) and the odds ratio (OR), we demonstrated a correlation between higher serum YKL-40 levels and tumour location in the descending colon (OR = 0.97;  $p > 0.02$ ; Table IV, Figure 3).

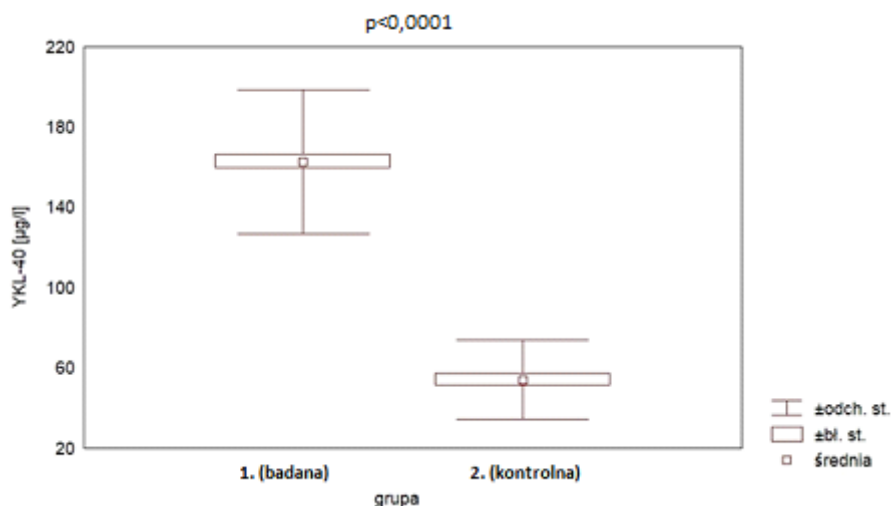
## DISCUSSION

One of the major challenges in the diagnosis and treatment of CRC is the identification of novel prognostic biomarkers that would enable rapid, inexpensive, easy, and effective detection of this cancer at an early stage and thus facilitate the establishment of an appropriate treatment strategy for CRC patients. In recent years, much research has been directed toward finding biomarkers that can easily be determined (e.g. from the patient's serum) and included in regular screening. Currently, one of the



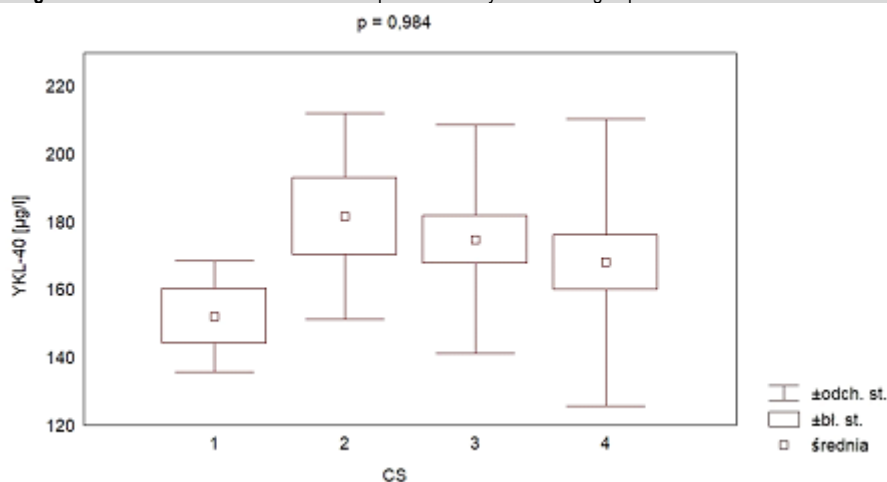
Tabela III. Wartości stężenia białka YKL-40 w surowicy pacjentów z grup badanej i kontrolnej  
Table III. Serum concentration values of YKL-40 protein in study and control groups

Cecha kliniczna/ Clinical feature	Grupa badana/Study group		Grupa kontrolna/Control group		p-wartość/ p value
	liczba osób/ number of persons	śr. ± od. st./ average ± SD	liczba osób/ number of persons	śr. ± od. st./ average ± SD	
YKL-40 (µg/l)	91	163 ± 36	42	54 ± 20	< 0,0001



Ryc. 1. Stężenie YKL-40 w surowicy w grupach badanej i kontrolnej.

Fig. 1. Serum concentration values of YKL-40 protein in study and control groups.



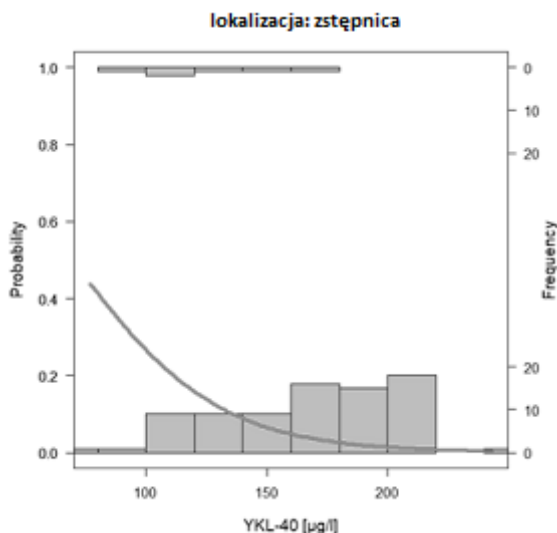
Ryc. 2. Średnie stężenia YKL-40 dla stopni zaawansowania nowotworowego CS.

Fig. 2. Mean YKL-40 concentration for CS.

Tabela IV. Ilorazy szans dla YKL-40 w lokalizacji guza w zstępnicy

Table IV. Odds ratios for YKL-40 in tumour location in descending colon

Lokalizacja/ Location	Liczba osób/ Number of persons	Czynnik ryzyka/ Risk factor	OR	Przedział 95% ufności/ 95% confidence interval	wartość p/ p-value
Zstępnica/ Descending colon	6	YKL-40 (µg/l)	0,97	(0,94; 0,99)	0,02



Ryc. 3. Krzywa prawdopodobieństwa wystąpienia guza zlokalizowanego w zstępnicy względem YKL-40.

Fig. 3. Probability curve of tumour located in descending colon relative to YKL-40.

## DYSKUSJA

Jednym z ważniejszych wyzwań w diagnostyce i leczeniu CRC jest identyfikacja nowych biomarkerów prognostycznych, które pozwoliłyby na szybkie, tanie, łatwe i skuteczne wykrywanie tego nowotworu we wczesnym stadium zaawansowania, a co się z tym wiąże – ułatwiłyby ustalanie odpowiedniej strategii leczenia pacjentów z CRC. W ostatnich latach wiele badań prowadzonych jest w celu znalezienia biomarkerów, które można w łatwy sposób określić (np. z surowicy pacjenta) oraz włączyć do regularnych badań przesiewowych. Jednym z najczęściej stosowanych aktualnie markerów nowotworowych CRC jest antygen rakowo-płodowy (*carcinoembryonic antigen* – CEA). Nie jest on jednak specyficzny dla CRC i ma ograniczone zastosowanie kliniczne [20,21,22]. W badaniu własnym oceniono przydatność kliniczną białka YKL-40 jako biomarkera CRC – czynnika wskazującego na występowanie CRC, a także umożliwiającego ocenę prognostyczną związaną ze stadium zaawansowania nowotworowego.

YKL-40 odgrywa ważną rolę w różnych procesach biologicznych, takich jak zapalenie, proliferacja i różnicowanie komórek, angiogeneza, apoptoza, czy też przebudowa macierzy komórkowej [8,23] – w procesach ważnych dla rozwoju raka i jego przerzutów [24]. Stężenie YKL-40 w surowicy osób zdrowych wynosi około 40 µg/l [25]. W badaniu własnym w grupie pacjentów zdrowych wartość ta wynosiła  $54 \pm 20$  µg/l. U osób z CRC zaobserwowano istotnie wyższe stężenia YKL-40 ( $163 \pm 36$  µg/l) niż w grupie kontrolnej

most commonly used CRC markers is the carcinoembryonic antigen (CEA). However, it is not specific for CRC and has a limited clinical application [20,21,22]. In our study, we evaluated the clinical utility of the YKL-40 protein as a biomarker of CRC a factor that both indicates the presence of CRC and enables prognostic evaluation in determining the stage of cancer.

YKL-40 plays an important role in various biological processes such as inflammation, cell proliferation and differentiation, angiogenesis, apoptosis, or cellular matrix remodelling [8,23] – processes that are important for the progression of cancer growth and metastasis [24]. The serum concentration of YKL-40 in healthy individuals is approximately 40 µg/l [25]. In our study, this value was  $54 \pm 20$  µg/l in the healthy patients. We observed significantly higher YKL-40 concentrations ( $163 \pm 36$  µg/l) in the CRC patients compared to the control group ( $p < 0.0001$ ). Numerous sources mention elevated YKL-40 protein levels in CRC patients compared to the healthy population [26]. In a study by Johansen et al. [16], the serum YKL-40 levels were found to be increased by more than 25% in patients with inflammatory or cancerous conditions compared to healthy subjects. Comparing our results to other publications, we obtained results approximating those reported in a subsequent paper by Johansen et al. [27], where the YKL-40 levels were higher in patients diagnosed with CRC (mean 126 µg/l for colon cancer and 104 µg/l for rectal cancer) compared to a group of healthy subjects (62 µg/l;  $p < 0.0001$ ). It should be noted that chronic inflammation is a factor in the development of CRC. YKL-40 stimulates intestinal epithelial growth in response to inflammation, while the chitin-binding fragment of YKL-40 itself is associated with the activation of Akt (protein kinase B) signalling in the colonic epithelium, thereby increasing the secretion of proinflammatory cytokines (IL-8, TNF- $\alpha$ ), while promoting epithelial cell proliferation and the intensification of carcinogenesis [28,29]. Previous studies indicate elevated serum levels of YKL-40 in various cancer patients – human cancer cells producing YKL-40 include not only CRC cells but also osteosarcoma, glioma, ovarian, prostate and melanoma cells [30].

Colorectal cancer is an insidious disease entity that is asymptomatic in its early stages; therefore, the detection of this cancer is difficult and most confirmed cases are diagnosed in the late stages [31]. In neoplastic diseases, the blood levels of YKL-40 fluctuate and are influenced, among others, by the type of cancer or the stage of the disease [17]. Cancer that does not infiltrate the submucosa is called early carcinoma, and the degree of CRC submucosal infiltration is extremely important as it determines the



( $p < 0,0001$ ). W licznych źródłach wymienionych przez Eurich i wsp. [26] stwierdzano podwyższone stężenia białka YKL-40 u osób z CRC w porównaniu ze zdrową populacją. Johansen i wsp. [16] wykazali wzrost stężenia YKL-40 o ponad 25% w surowicy u pacjentów ze schorzeniami zapalnymi lub nowotworowymi w porównaniu z osobami zdrowymi. W badaniu własnym uzyskano wyniki przybliżone do przedstawionych w kolejnej pracy Johansen i wsp. [27], gdzie stężenie YKL-40 było wyższe u chorych ze zdiagnozowanym CRC (śr. 126  $\mu\text{g/l}$  dla raka okrężnicy oraz 104  $\mu\text{g/l}$  dla raka odbytnicy) niż u osób zdrowych (62  $\mu\text{g/l}$ ;  $p < 0,0001$ ). Należy zaznaczyć, iż przewlekły stan zapalny jest czynnikiem rozwoju CRC. YKL-40 stymuluje wzrost nabłonka jelitowego w odpowiedzi na stan zapalny, a sam fragment YKL-40 wiążący chitynę jest związany z aktywacją sygnalizacji Akt (*protein kinase B*) w nabłonku okrężnicy, przez co zwiększa wydzielanie cytokin prozapalnych (IL-8, TNF- $\alpha$ ), sprzyjając jednocześnie proliferacji komórek nabłonkowych i intensyfikacji procesów nowotworzenia [28,29]. Dotychczasowe badania wskazują na podwyższone stężenie YKL-40 w surowicy u różnych pacjentów onkologicznych – do ludzkich komórek nowotworowych wytwarzających YKL-40 zalicza się nie tylko komórki CRC, ale również komórki kostniakomięsaka, glejaka, jajnika, stercza oraz czerniaka [30].

Rak jelita grubego jest podstępą jednostką chorobową, która we wczesnych stadiach nie daje objawów klinicznych, dlatego wykrycie nowotworu jest trudne, a większość potwierdzonych przypadków diagnozowanych jest w późnych stadiach [31]. W chorobach nowotworowych stężenie YKL-40 we krwi zmienia się, na co wpływa m.in. typ raka czy stopień zaawansowania choroby [17]. Rak, który nie przekracza błony podśluzowej, nazywany jest rakiem wczesnym; stopień nacieku błony podśluzowej CRC jest niezmiernie istotny, gdyż według wielu wytycznych decyduje on o dalszym postępowaniu i leczeniu [30].

W badaniu własnym wykazano różnicę stężeń badanej proteiny w raku wczesnym CSI (151  $\pm$  16  $\mu\text{g/l}$ ) i pozostałych stadiach nowotworu, tj. średniozaawansowanym CSII (180  $\pm$  29  $\mu\text{g/l}$ ), zaawansowanym CSIII (173  $\pm$  33  $\mu\text{g/l}$ ) oraz uogólnionym CSIV (169  $\pm$  38  $\mu\text{g/l}$ ). Na podstawie uzyskanych wyników można zauważyć, iż znacząca różnica stężeń YKL-40 występuje między rakiem CSI i CSII. Do podobnych wniosków doszli Fuksiewicz i wsp. [32], którzy ocenili związek między stężeniem YKL-40 a wielkością guza oraz stanem węzłów chłonnych (TNM). Wykazali, iż wyższy poziom YKL-40 w surowicy występuje u pacjentów z guzem T3 niż T1. Być może w niektórych przypadkach klinicznych ocena stężenia tego markera wpłynie na strategię postępowania pooperacyjnego, oceniającą konieczność wprowadzenia chemioterapii adiuwantowej u chorych z CSII.

choice of further management and treatment according to many guidelines [30].

In our study, we found a difference in the serum concentrations of the protein we studied between early CSI cancer (151  $\pm$  16  $\mu\text{g/l}$ ) and the other stages of cancer, i.e. intermediate CSII (180  $\pm$  29  $\mu\text{g/l}$ ), advanced CSIII (173  $\pm$  33  $\mu\text{g/l}$ ) and generalised CSIV (169  $\pm$  38  $\mu\text{g/l}$ ). Based on our results, it can be observed that there is a significant difference in the YKL-40 concentrations between CSI and CSII cancers. Similar observations were described in a publication by Fuksiewicz et al. [32], where the relationship between the YKL-40 levels and tumour size as well as lymph node status (TNM) was evaluated. It was then shown that higher serum levels of YKL-40 were noted in patients with T3 tumours compared to patients with T1 tumours. It is possible that in some clinical cases, the assessment of the concentration of this marker will influence the postoperative management strategy, evaluating the need for adjuvant chemotherapy in patients with CSII. Nevertheless, in our study, we did not find a correlation between the serum YKL-40 protein levels in CRC patients and the histological malignancy grade (G). Currently, there is not much data in the available literature on this topic; hence, determination of the above correlations requires further research.

YKL-40 concentrations are not affected by the time of day, sex or body weight [13]. Considering the clinical parameters, i.e. sex, age, body weight, or BMI in subjects with CRC, the above study did not reveal a relationship between them and the serum YKL-40 protein concentrations or the presence of CRC itself. These results proved to be statistically insignificant. By paying attention to the location of the tumour in the colon, our study and observations showed that the YKL-40 protein was a statistically significant predictor ( $p = 0.02$ ) of the presence of a tumour located in the descending colon (OR = 0.97;  $p < 0.05$ ), meaning that the higher the serum YKL-40 protein concentration, the higher the likelihood of a colorectal tumour in the descending colon. Different results were obtained by Johansen et al. [27], who found no statistically significant relationship between the colon tumour location and YKL-40 protein levels. Nonetheless, there is still too little data on the relationship between the YKL-40 protein and tumour location in CRC; thus, it would be important to expand the study with further observations involving a larger number of patients.

YKL-40, a glycoprotein produced, for example, by macrophages, acts as an angiogenic factor, promoting tumour angiogenesis [33]. Studies are being conducted to identify a monoclonal antibody as





W badaniu własnym nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem białka YKL40 w surowicy osób z CRC a stopniem złośliwości histologicznej (*grade – G*). W dostępnym piśmiennictwie nie ma wielu danych na ten temat, dlatego określenie powyższych korelacji wymaga dalszych badań.

Pora dnia, płeć czy masa ciała nie wpływają na stężenie YKL-40 [13]. W badaniu własnym u osób z CRC nie wykazano zależności między parametrami klinicznymi, takimi jak płeć, wiek, masa ciała, BMI, a wartościami stężeń białka YKL-40 w surowicy, czy też samą obecnością CRC. Wyniki te okazały się statystycznie nieistotne.

Zwracając uwagę na lokalizację guza w okrężnicy, badania i obserwacje własne wykazały, iż białko YKL-40 jest statystycznie istotnym predyktorem ( $p = 0,02$ ) guza zlokalizowanego w zstępnicy ( $OR = 0,97$ ;  $p < 0,05$ ), co oznacza, iż im większe stężenie białka YKL-40 w surowicy, tym większe prawdopodobieństwo guza jelita grubego zlokalizowanego w okrężnicy zstępującej. Odmienne wyniki uzyskali Johansen i wsp. [27], którzy nie znaleźli istotnej statystycznie zależności pomiędzy lokalizacją guza okrężnicy a stężeniem białka YKL-40. Wciąż jednak zbyt mało danych na temat zależności między stężeniem białka YKL-40 a lokalizacją guza w CRC, dlatego też istotne byłoby poszerzenie badań o dalsze obserwacje obejmujące większą liczbę chorych.

YKL-40, glikoproteina wytwarzana m.in. przez makrofagi, działa jako czynnik angiogeny, promując angiogenezę guza [33]. Prowadzone są badania mające na celu identyfikację przeciwciała monoklonalnego jako potencjalnego czynnika neutralizującego, który może blokować aktywność angiogenną YKL-40. Faibish i wsp. [34] zidentyfikowali przeciwciało monoklonalne swoiste dla YKL-40. Autorzy wykazali, że może ono neutralizować funkcje YKL-40 zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Odkrycie to, a także kontynuacja badań nad białkiem YKL-40 oraz określenie znaczenia przeciwciała monoklonalnego anty-YKL-40 mogą odgrywać ogromną rolę w nowych metodach terapeutycznych w CRC.

## WNIOSKI

W pracy wykazano, iż badanie stężenia YKL-40 w surowicy może być przydatne w diagnostyce CRC. Białko YKL-40 może stanowić czynnik rokowniczo niepomysłny dla CRC – jego stężenie jest wyższe w zaawansowanych stadiach nowotworu, kiedy guz przekroczył błonę podśluzową jelita (CSII). Wartości stężeń YKL-40 w surowicy, jako predyktora guza jelita grubego w zstępnicy, mogą dać informacje pomocne w lepszym zrozumieniu zjawiska stronności jelita grubego i określeniu potencjalnej lokalizacji guza. Nie wykazano zależności między wybranymi parametrami

a potential neutralising agent that can block the angiogenic activity of YKL-40. In their paper, Faibish et al. [34] describe a study in which they identify a monoclonal antibody specific for YKL-40. It was shown that it can neutralise the functions of YKL-40 both *in vitro* and *in vivo*. This discovery, as well as continued research on the YKL-40 protein and determination of the importance of the anti-YKL-40 monoclonal antibody, may play a huge role in proposing new potential therapeutic approaches in CRC.

## CONCLUSIONS

In conclusion, we have shown that the study of YKL-40 serum levels can be useful in the diagnosis of CRC. The YKL-40 protein may be a prognostic factor for an unfavourable CRC prognosis – its levels are higher in advanced stages of cancer, where the tumour has infiltrated the intestinal submucosa (CSII). The values of serum YKL-40 concentrations as a predictor of colorectal tumour presence in the descending colon may provide information for a better understanding of the colorectal bias phenomenon and the identification of a potential tumour location. However, considering the selected clinical parameters, i.e. sex, age, BMI, and cancer malignancy grade in CRC patients, no relationship was shown between them and the serum YKL-40 protein levels.

Continued research on the YKL-40 protein may provide a potential opportunity to obtain new diagnostic and therapeutic algorithms in CRC. The YKL-40 protein appears to be a promising biomarker of CRC.



klinicznymi, tj. płcią, wiekiem, BMI, stopniem złośliwości nowotworu u osób z CRC, a stężeniem białka YKL-40 w surowicy.

Kontynuacja badań nad białkiem YKL-40 może być szansą na uzyskanie nowych algorytmów diagnostycznych i terapeutycznych w CRC. Białko YKL-40 wydaje się obiecującym biomarkerem CRC.

#### Author's contribution

Study design – D. Nadbrzeźna-Barczyk, D. Waniczek, Z. Lorenc

Data collection – D. Nadbrzeźna-Barczyk, D. Waniczek, E. Nowakowska-Zajdel, A. Copija, A. Raźnikiewicz

Data interpretation – D. Nadbrzeźna-Barczyk, D. Waniczek, E. Świętochowska, E. Nowakowska-Zajdel, M. Rykaczewska-Czerwińska, Z. Lorenc

Statistical analysis – D. Nadbrzeźna-Barczyk

Manuscript preparation – D. Nadbrzeźna-Barczyk, D. Waniczek, E. Świętochowska, E. Nowakowska-Zajdel, M. Rykaczewska-Czerwińska, Z. Lorenc

Literature research – D. Nadbrzeźna-Barczyk, D. Waniczek, A. Copija, A. Raźnikiewicz

## PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

1. Labianca R., Nordlinger B., Beretta G.D., Mosconi S., Mandalà M., Cervantes A., Arnold D. Early colon cancer: ESMO Clinical Practise Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2013; 24 Suppl. 6: 64–72, doi: 10.1093/annonc/mdt354.
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018; 68(6): 394–424, doi: 10.3322/caac.21492.
3. Amersi F., Agustin M., Ko C.Y. *Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services.* *Clin. Colon Rectal Surg.* 2005; 18(3): 133–140, doi: 10.1055/s-2005-916274.
4. OECD. Health at a Glance 2015: OECD Indicators. OECD Publishing, Paris 2015, doi: 10.1787/health\_glance-2015-en.
5. Fleming M., Ravula S., Tatishchev S.F., Wang H.L. Colorectal carcinoma: pathologic aspects. *J. Gastrointest. Oncol.* 2012; 3(3): 153–173, doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030.
6. Burch J.A., Soares-Weiser K., St John D.J.B., Duffy S., Smith S., Kleijnen J., Westwood M. Diagnostic accuracy of faecal occult blood tests used in screening for colorectal cancer: a systematic review. *J. Med. Screen.* 2007; 14(3): 132–137, doi: 10.1258/096914107782066220.
7. Schoen R.E., Pinsky P.F., Weissfeld J.L., Yokochi L.A., Church T., Laiyemo A.O. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366(25): 2345–2357, doi: 10.1056/NEJMoa1114635.
8. Johansen J.S., Schultz N.A., Jensen B.V. Plasma YKL-40: a potential new cancer biomarker? *Future Oncol.* 2009; 5(7): 1065–1082, doi: 10.2217/fo.09.66.
9. Hakala B.E., White C., Recklies A.D. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(34): 25803–25810.
10. Johansen J.S., Hoyer P.E., Larsen L.A., Price P.A., Møllgård K. YKL-40 protein expression in the early developing human musculoskeletal system. *J. Histochem. Cytochem.* 2007; 55(12): 1213–1228, doi: 10.1369/jhc.7A7245.2007.
11. Prakash M., Bodas M., Prakash D., Nawani N., Khetmalas M., Mandal A., Eriksson C. Diverse pathological implications of YKL-40: answers may lie in 'outside-in' signaling. *Cell Signal.* 2013; 25(7): 1567–1573, doi: 10.1016/j.cellsig.2013.03.016.
12. He C.H., Lee C.G., Dela Cruz C.S., Lee C.M., Zhou Y., Ahangari F. et al. Chitinase 3-like 1 regulates cellular and tissue responses via IL-13 receptor  $\alpha 2$ . *Cell Rep.* 2013; 4(4): 830–841, doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.032.
13. Schultz N.A., Johansen J.S. YKL-40 – A protein in the field of translational medicine: a role as a biomarker in cancer patients? *Cancers* 2010; 2(3): 1453–1491, doi: 10.3390/cancers2031453.
14. Recklies A.D., White C., Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem. J.* 2002; 365(Pt 1): 119–126, doi: 10.1042/BJ20020075.
15. Recklies A.D., Ling H., White C., Bernier S.M. Inflammatory cytokines induce production of CHI3L1 by articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(50): 41213–41221, doi: 10.1074/jbc.M510146200.
16. Johansen J.S., Jensen B.V., Roslind A., Price P.A. Is YKL-40 a new therapeutic target in cancer? *Expert Opin. Ther. Targets* 2007; 11(2): 219–234, doi: 10.1517/14728222.11.2.219.
17. Cintin C., Johansen J.S., Christensen I.J., Price P.A., Sørensen S., Nielsen H.J. High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival. *Cancer* 2002; 95(2): 267–274, doi: 10.1002/cncr.10644.
18. Lequin R.M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* 2005; 51(12): 2415–2418, doi: 10.1373/clinchem.2005.051532.
19. R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna 2018.
20. Kievit J., van de Velde C.J.M. Utility and cost of carcinoembryonic antigen monitoring in colon cancer follow-up evaluation: a Markov analysis. *Cancer* 1990; 65(11): 2580–2587.
21. Virgo K.S.Jr, Vernava A.M., Longo W.E., McKirgan L.W., Johnson F.E. Cost of patient follow-up after potentially curative colorectal cancer treatment. *JAMA.* 1995; 273(23): 1837–1841.
22. Lucha P.A., Rosen L., Olenwine J.A., Reed J.F., 3<sup>rd</sup> Riether R.D., Stasik J.J., Jr Khubchandani I.T. Value of carcinoembryonic antigen monitoring in curative surgery for recurrent colorectal carcinoma. *Dis. Colon Rectum* 1997; 40(2): 145–149, doi: 10.1007/BF02054978.
23. Lee C.G., Hartl D., Lee G.R., Koller B., Matsuura H., Da Silva C.A. et al. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J. Exp. Med.* 2009; 206(5): 1149–1166, doi: 10.1084/jem.20081271.
24. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012; 21(3): 309–322, doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
25. Johansen J.S., Lottenburger T., Nielsen H.J., Jensen J.E., Svendsen M.N., Kollerup G., Christensen I.J. Diurnal, weekly, and long-time variation in serum concentrations of YKL-40 in healthy subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008; 17(10): 2603–2608, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2766.
26. Eurich K., Segawa M., Toei-Shimizu S., Mizoguchi E. Potential role of chitinase 3-like-1 in inflammation-associated carcinogenic changes of epithelial cells. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15(42): 5249–5259, doi: 10.3748/wjg.15.5249.
27. Johansen J.S., Christensen I.J., Jørgensen L.N., Olsen J., Rahr H.B., Nielsen K.T. et al. Serum YKL-40 in risk assessment for colorectal cancer: A prospective study of 4496 subjects at risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2015; 24(3): 621–626, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1281.
28. Chen C.C., Llado V., Eurich K., Tran H.T., Mizoguchi E. Carbohydrate-binding motif in chitinase 3-like 1 (CHI3L1/YKL-40) specifically activates Akt signaling pathway in colonic epithelial cells. *Clin Immunol.* 2011; 140(3): 268–275, doi: 10.1016/j.clim.2011.04.007.



29. Kawada M., Chen C.C., Arihiro A., Nagatani K., Watanabe T., Mizoguchi E. Chitinase 3-like-1 enhances bacterial adhesion to colonic epithelial cells through the interaction with bacterial chitin-binding protein. *Lab. Invest.* 2008; 88(8): 883–895, doi: 10.1038/labinvest.2008.47.
30. Matsui T., Yao T., Iwashita A. Natural history of early colorectal cancer. *World J. Surg.* 2000; 24(9): 1022–1028, doi: 10.1007/s002680010153.
31. Nowacki M. Rak jelita grubego. [W:] *Onkologia kliniczna. T. 2.* Red. M. Krzakowski, P. Potemski, K. Warzocha, P. Wysocki. Via Medica. Gdańsk 2015, s. 888–911.
32. Fuksiewicz M., Kotowicz B., Rutkowski A., Achinger-Kawecka J., Wagrodzki M., Kowalska M.M. The assessment of clinical usage and prognostic value of YKL-40 serum levels in patients with rectal cancer without distant metastasis. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2018; 17: 1–8, doi: 10.1177/1533033818765209.
33. Shao R., Hamel K., Petersen L., Cao Q.J., Arenas R.B., Bigelow C. et al. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene* 2009; 28(50): 4456–4468, doi: 10.1038/onc.2009.292.
34. Faibish M., Francescone R., Bentley B., Yan W., Shao R. A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. *Mol. Cancer Ther.* 2011; 10(5): 742–751, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0868.