

Mateusz Brożyna

**ANALIZA I ROLA SERPINY-E2
ORAZ WYDZIELNICZEGO INHIBITORA
PROTEINAZY LEUKOCYTARNEJ (SLPI)
W PATOGENEZIE I PROGRESJI RAKA TARCZYCY**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Kierownik Kliniki Chirurgii Endokrynologicznej, Ogólnej i Naczyniowej

prof. dr hab. n. med. Krzysztof Kuzdak

Promotor: dr hab. n. med. Tomasz Stępień

ŁÓDŹ 2019

Streszczenie

Wstęp

Nowotwory złośliwe stają się poważnym problemem dla współczesnego świata. Stanowią już drugą przyczynę zgonów w Polsce i na świecie. Rak tarczycy jest najczęstszym nowotworem złośliwym gruczołów wydzielania wewnętrznego (ponad 90%). W literaturze naukowej występuje wiele prac mówiących o klinicznych, cytologicznych oraz molekularnych markerach nowotworów tarczycy. Jednakże z uwagi na liczbę podtypów raków, ich budowę na poziomie komórkowym, a także genetyczną specyfikę nowotwór ten wymaga dalszych badań.

Cel pracy

Celem pracy było określenie potencjalnej roli SERPINY-E2 oraz SLPI w patogenezie raka tarczycy, a także stwierdzenie, czy stężenie omawianych inhibitorów w surowicy można uznać za dodatkowe czynniki prognostyczne u chorych z rozpoznany rakiem tarczycy.

Material i metody

Do badania zakwalifikowano 86 pacjentów w wieku 18-83 (średnia wieku \pm SEM 55,5 \pm 5,2 lat) lat leczonych chirurgicznie w Klinice Chirurgii Endokrynologicznej WSS im. M. Kopernika w Łodzi w latach 2015-2019.

Badaną grupę podzielono ze względu na wynik badania histo-patologicznego. Uzyskano 5 grup, w których stwierdzono:

- 36 pacjentów z rozpoznaniem raka brodawkowego (PTC) /średnia wieku \pm SEM 52,7 \pm 11,2/,
- 11 pacjentów z rakiem pęcherzykowym (NTC) /średnia wieku \pm SEM 55,4 \pm 2,4/,
- 9 pacjentów z rakiem anaplastycznym (ATC) /średnia wieku \pm SEM 66,0 \pm 3,2/,
- 11 pacjentów z rakiem rdzeniastym (MTC) /średnia wieku \pm SEM 57,5 \pm 2,5/,
- 19 chorych z wolem guzowatym obojętnym SNN (WGO) /średnia wieku \pm SEM 54,7 \pm 10,2/.

Wybrane przypadki zostały zdiagnozowane na podstawie wyniku biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC) oraz potwierdzone poprzez pooperacyjne badanie histopatologiczne.

Grupę kontrolną (K) stanowiło 20 zdrowych ochotników o zbliżonej charakterystyce demograficznej do grupy badanej (średnia wieku \pm SEM 55,2 \pm 9,8). Grupa ta zawierała pacjentów bez jakiegokolwiek choroby tarczycy.

Materiałem do badania były próbki krwi pacjentów z grupy badanej i kontrolnej, pozostających na czczo, pobrane z żyły łokciowej między godziną 7:00 i 8:00 dzień przed planowanym zabiegiem operacyjnym. Próbkę krwi poddano obróbce w ciągu jednej godziny od pobrania, surowice podzielono na porcje i następnie przechowywano w temperaturze -80°C do czasu analizy.

Oznaczenia stężeń badanych czynników przeprowadzono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA.

Wyniki

Pacjenci z rakiem brodawkowym

Średnie stężenie SERPINY-E2 w surowicy chorych (1208,6 \pm 93,9 pg/mL) było istotnie wyższe niż uzyskane w grupie chorych z SNN (700,1 \pm 98,7 pg/mL; $p<0,01$) oraz w grupie kontrolnej (686,8 \pm 104,6 pg/mL; $p<0,01$). Również średnie stężenie SLPI w surowicy pacjentów z rakiem brodawkowym tarczycy (3181,6 \pm 252,5 pg/mL) było istotnie wyższe w porównaniu do grupy SNN (2060,8 \pm 363,3 pg/mL; $p<0,05$) oraz grupy kontrolnej (1806,7 \pm 346,9 pg/mL; $p<0,01$).

Pacjenci z rakiem pęcherzykowym

W tej grupie chorych zaobserwowano w surowicy istotnie statystyczną różnicę w średnim poziomie SERPINY-E2 (1281,1 \pm 191,5 pg/mL) w porównaniu do grupy chorych z SNN ($p<0,01$) oraz grupy kontrolnej ($p<0,01$). W przypadku średniego stężenia SLPI w surowicy (3135,7 \pm 491,0 pg/mL) stwierdzono brak istotności statystycznej w porównaniu do stężeń u pacjentów grupy SNN ($p>0,05$) oraz istotną statystycznie różnicę w stosunku do grupy kontrolnej ($p<0,05$).

Pacjenci z rakiem rdzeniastym

Średnie stężenia SERPINY-E2 w surowicy tych pacjentów ($1192,1 \pm 135,6$ pg/mL) były wyższe niż uzyskane w grupie chorych z wolem guzowatym obojętnym ($<0,01$) oraz w grupie kontrolnej ($p < 0,05$). Natomiast średnie stężenie SLPI w surowicy pacjentów z rakiem rdzeniastym tarczycy ($2994,6 \pm 441,2$ pg/mL) nie było istotnie wyższe w porównaniu do stężenia surowicy grupy SNN ($p > 0,05$) oraz grupy kontrolnej ($p > 0,05$).

Pacjenci z rakiem anaplastycznym

W grupie tej zaobserwowano istotnie statystyczną różnicę w średnim stężeniu SERPINY-E2 w surowicy ($1543,4 \pm 179,0$ pg/mL) w porównaniu do stężeń u pacjentów grupy SNN ($p < 0,01$) oraz stężeń u osób grupy kontrolnej ($p < 0,001$). W przypadku SLPI średnie stężenie tego inhibitora w surowicy pacjentów z rakiem anaplastycznym tarczycy ($4047,9 \pm 388,2$ pg/mL) było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy SNN ($p < 0,01$) oraz w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,001$).

Pacjenci z grupy kontrolnej

Grupa wykazała bardzo silną korelację liniową stężeń SERPINY-E2 i SLPI ($r = +0,9613$; $p < 0,001$).

Pacjenci z wolem guzowatym obojętnym

W grupie chorych zaobserwowano bardzo silną korelację liniową stężeń SERPINY-E2 i SLPI ($r = +0,9574$; $p < 0,001$).

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników niniejszej pracy wyciągnąłem następujące wnioski:

1. Chorych z rakiem brodawkowatym, pęcherzykowym i anaplastycznym charakteryzuje znamienne wyższe stężenie SERPINY-E2 w porównaniu z chorymi z WGO.
2. Chorych z rakiem brodawkowatym, pęcherzykowym i anaplastycznym charakteryzuje statystycznie istotne podwyższenie SLPI.

3. Stężenie SLPI u chorych z rakiem rdzeniastym tarczycy nie różni się statystycznie istotnie od stężenia stwierdzonego u chorych z WGO oraz u osób zdrowych.
4. Stężenia SERPINY-E2 oraz SLPI chorych z WGO nie różnią się istotnie od stężeń obserwowanych u osób zdrowych.

Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że w surowicy chorych z rakiem tarczycy stężenie inhibitorów SERPINY-E2 oraz SLPI jest znacznie wyższe niż u pacjentów ze zmianami łagodnymi tarczycy oraz u osób bez patologii w obrębie tego gruczołu.

Ponadto stężenia SERPINY-E2 oraz SLPI u osób z wolem obojętnym tarczycy nie różnią się istotnie od tych obserwowanych u osób zdrowych. Wyniki te mogą sugerować, że powyższe inhibitory proteazy serynowej biorą udział w powstawaniu zmian złośliwych tarczycy i są zgodne z wynikami innych autorów, mówiącymi o roli SERPINY-E2 oraz SLPI w proliferacji komórek nowotworowych.

Silnie dodatnia korelacja pomiędzy stężeniami SERPINY-E2 i SLPI u pacjentów z rakiem tarczycy może dodatkowo potwierdzać hipotezę, że inhibitory te mogą brać udział w powstawaniu nowotworów tarczycy.

Wyniki z przeprowadzonego badania wskazują, że oznaczanie w surowicy stężeń SERPINY-E2 i SLPI może posłużyć jako przedoperacyjne różnicowanie łagodnych i złośliwych guzów tarczycy.

Jednak mechanizm odpowiedzialny za nadekspresję SERPINY-E2 oraz SLPI u chorych z rozpoznaniem rakiem tarczycy pozostaje nieznany, dlatego potrzebne są dalsze badania celem weryfikacji wyników i dokładnej analizy, na poziomie molekularnym, transformacji nowotworowej prawidłowych komórek tarczycy.

Summary

Admission

Malignant neoplasms constitute a significant issue for the modern world. Both in Poland and worldwide are the second most common cause of death. Thyroid cancer is the most frequent malignant tumor of the endocrine glands (over 90%). Scientific literature is the source of numerous articles appealing to thyroid cancer clinical, cytological and molecular markers. However, due to the variety of cancer subtypes, their cellular structure as well as the genetic specificity, this cancer requires further research.

Objective of the study

The aim of the study was to determine the potential role of SERPINE2 and SLPI in the pathogenesis of thyroid cancer, furthermore ascertain whether the serum concentration of the inhibitors in question can be considered as additional prognostic factors in patients with diagnosed thyroid cancer.

Material and methods

The study included 86 patients aged 18-83 (average age 55.5 ± 5.2) years who were surgically treated in the Department of Endocrinological Surgery of the Copernicus Provincial Specialist Hospital in Łódź between 2015-2019.

The studied group was divided according to the result of histopathological examination. Five groups were obtained, in which:

- 36 patients with papillary carcinoma (PTC)/average age SEM 52.7 ± 11.2 ;
- 11 patients with follicular carcinoma (FTC)/average age SEM 55.4 ± 2.4 ;
- 9 patients with anaplastic carcinoma (ATC)/average age SEM 66.0 ± 3.2 ;
- 11 patients with medullary carcinoma (MTC)/average age SEM 57.5 ± 2.5 ;
- 19 patients with nodular gland SNN (WGO)/average age SEM 54.7 ± 10.2 .

Selected cases were diagnosed on the basis of the results of fine needle aspiration (FNA) and confirmed by postoperative histopathological examination.

The control group (K) consisted of 20 healthy volunteers with similar demographic characteristics to the study group (average age SEM 55.2±9.8). This group included patients without any thyroid disease.

The material for the study was blood samples from the examined and control group, fasting, taken from the elbow vein between 7:00 a.m. and 8:00 a.m. the day before the planned surgery. Blood samples were treated within one hour of collection, sera were divided into portions and then stored at 80°C until analysis.

The concentrations of the analyzed factors were determined using the ELISA immunoenzymatic test.

Results

Papillary cancer patients

Average serum SERPINE2 concentration in patients (1208.6±93.9 pg/mL) was significantly higher than in patients with SNN (700.1±98.7 pg/mL; $p < 0.01$) and in controls (686.8±104.6 pg/mL; $p < 0.01$). Simultaneously the average serum SLPI concentration in patients with papillary thyroid carcinoma (3181.6±252.5 pg/mL) was remarkably higher than in the SNN group (2060.8±363.3 pg/mL; $p < 0.05$) and in the control group (1806.7±346.9 pg/mL; $p < 0.01$).

Vesicular cancer patients

In this group of patients a notable statistical difference in serum level of SERPINE2 (1281.1±191.5 pg/mL) was observed in comparison to SNN ($p < 0.01$) and control group ($p < 0.01$). Average serum SLPI concentration (3135.7±491.0 pg/mL) was statistically insignificant compared to SNN group ($p > 0.05$) and numerically consequential difference to control group ($p < 0.05$).

Spinal cancer patients

Average serum SERPINE2 concentrations in these patients (1192.1 ± 135.6 pg/mL) were higher than in the group of patients with neutral nodular gland (<0.01) and in the control group ($p < 0.05$). Average serum SLPI concentration in patients with thyroid spinal carcinoma (2994.6 ± 441.2 pg/mL) was not importantly higher compared to SNN serum concentration ($p > 0.05$) and control serum concentration ($p > 0.05$).

Anaplastic cancer patients

In this group a significant statistical difference was observed in average serum SERPINE2 concentration (1543.4 ± 179.0 pg/mL) compared to SNN group ($p < 0.01$) and control group ($p < 0.001$). In SLPI, the average serum concentration of this inhibitor in patients with anaplastic thyroid cancer (4047.9 ± 388.2 pg/mL) was statistically significantly higher compared to SNN group ($p < 0.01$) and control group ($p < 0.001$).

Control group patients

The group showed a very strong linear correlation between SERPINE2 and SLPI ($r = +0.9613$; $p < 0.001$).

Struma nodosa neutralis patients

In the group of patients a very strong linear correlation of SERPINE2 and SLPI concentrations was observed ($r = +0.9574$; $p < 0.001$).

Conclusions

On the basis of the results of this study, I have drawn the following conclusions:

1. Patients with papillary, vesicular and anaplastic carcinoma are characterized by significantly higher SERPINE2 concentration in comparison with patients with SNN.
2. Patients with papillary, vesicular and anaplastic carcinoma are characterized by statistically significant increase in SLPI.
3. SLPI concentration in patients with spinal thyroid carcinoma is not significantly different from that found in SNN patients and in healthy patients.

4. SERPINE2 and SLPI concentrations in SNN patients do not differ significantly from those observed in healthy patients.

The obtained results clearly indicate that serum concentrations of SERPINE2 and SLPI inhibitors in patients with thyroid cancer are significantly higher than in patients with mild thyroid lesions and in patients with no pathology within the thyroid gland.

Moreover, the concentrations of SERPINE2 and SLPI in patients with neutral thyroid gland do not differ significantly from those observed in healthy patients. These results may suggest that the serine protease inhibitors are involved in the formation of malignant thyroid lesions and are consistent with the results of other authors on the role of SERPINE2 and SLPI in cancer cell proliferation.

The strong positive correlation between SERPINE2 and SLPI concentrations in patients with thyroid cancer may further support the hypothesis that these inhibitors may be involved in the formation of thyroid cancer.

The results of the study indicate that serum determination of SERPINE2 and SLPI concentrations may serve as a preoperative differentiation of benign and malignant thyroid tumors.

However, the mechanism responsible for the overexpression of SERPINE2 and SLPI in patients with diagnosed thyroid cancer remains unknown, therefore further studies are needed to verify the results and accurately analyze, at the molecular level, the neoplastic transformation of normal thyroid cells.