

Magdalena Borkowska

**Ocena stężenia białek z rodziny Klotho  
w surowicy krwi jako potencjalnych  
czynników diagnostycznych w  
nowotworach tarczycy.**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor:

Dr hab. n. med. Tomasz Stępień  
Profesor UMed w Łodzi

Łódź 2020

# Streszczenie

## Wstęp

Rak tarczycy jest najczęściej występującym nowotworem gruczołów dokrewnych i stanowi ok. 1-2% nowotworów ogółem. Jak wynika z danych Krajowego Rejestru Nowotworów raka tarczycy rozpoznaje się w Polsce u ponad 4 tys. osób rocznie i zachorowalność cały czas wzrasta. Obecnie podstawowym badaniem przedoperacyjnym stosowanym w diagnostyce raka tarczycy jest biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana (BACC). Jednakże ograniczenia tego badania powodują, że nie zawsze wynik jest diagnostyczny. Liczba oznaczanych markerów raka tarczycy jest niewielka. Stosuje się tyreoglobulinę w kontroli pooperacyjnej w zróżnicowanych rakach tarczycy oraz kalcytoninę w raku rdzeniastym. Białko  $\alpha$  i  $\beta$  Klotho należą do rodziny białek Klotho. Pełnią one rolę koreceptorów dla czynników wzrostu fibroblastów z podrodziny 19, dzięki czemu biorą udział w regulacji licznych procesów ważnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek i tkanek. Doniesienia dotyczące powiązania białek  $\alpha$  i  $\beta$  Klotho z nowotworami litymi pokazują możliwość wykorzystania tych białek w diagnostyce raka tarczycy. Możliwość rozpoznawania raka tarczycy za pomocą oznaczania markerów w osoczu w okresie przedoperacyjnym umożliwiłaby lepszą diagnostykę guzów tarczycy oraz ułatwiła kwalifikację pacjentów do radykalnego leczenia operacyjnego.

## Cel pracy

Celem pracy było:

1. określenie stężeń białka  $\alpha$  i  $\beta$  Klotho w surowicy krwi chorych z nowotworami tarczycy (wole guzkowe obojętne, rak brodawkowaty, rak pęcherzykowy, rak rdzeniasty, rak anaplastyczny) w porównaniu z grupą kontrolną (osoby zdrowe)

2. ocena przydatności diagnostycznej oznaczania stężenia tych białek jako markerów złośliwości nowotworów gruczołu tarczowego w zależności od ich rodzaju.

## **Materiał i metoda**

Do badania włączono chorych zakwalifikowanych do planowej operacji wycięcia tarczycy na podstawie rozpoznania raka tarczycy lub podejrzenie nowotworu pęcherzykowego tarczycy (*Neoplasma folliculare*) w biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC). Badaniem objęto 86 pacjentów operowanych w latach 2014-2019 w Klinice Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, od których pobierano materiał tkankowy (krew).

Następnie chorzy zostali przydzieleni do jednej z grup na podstawie wyników badań histopatologicznych pooperacyjnego materiału tkankowego:

1. Chorzy z rakiem brodawkowatym (PTC) - 36
2. Chorzy z rakiem pęcherzykowym (FTC) – 11
3. Chorzy z rakiem anaplastycznym (ATC) - 9
4. Chorzy z rakiem rdzeniastym (MTC) - 11
5. Chorzy z wolem guzkowym obojętnym (SNN) – 19

Jako grupę kontrolną przyjęto 20 zdrowych ochotników, u których wykluczono jakiegokolwiek choroby tarczycy na podstawie badania klinicznego, laboratoryjnego (aTPO, aTG, TSH, fT3, fT4) oraz obrazowego (USG tarczycy).

Oznaczenia stężeń badanych czynników przeprowadzono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA. Wszystkie badania wykonano zgodnie z instrukcjami producenta w Zakładzie Immunoendokrynologii Katedry

Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wszystkie pomiary wykonano dwukrotnie i uśredniono.

Do analizy statystycznej użyto testu Shapiro-Wilka, ANOVA. Porównanie wartości średnich trzech lub więcej badanych grup przeprowadzono za pomocą analizy wariancji (ANOVA) i następnie testu NIR. Za poziom istotności statystycznej przyjęto  $p < 0,05$ . Wszystkie analizy przeprowadzono za pomocą programu Dell Statistica PL v. 13.1 (StatSoft Polska).

## **Wyniki**

W grupie wszystkich chorych z rakami tarczycy średnie stężenie białka  $\beta$  Klotho było istotnie statystycznie niższe niż w grupie kontrolnej ( $3242,0 \pm 205,61$  vs.  $7492,3 \pm 573,13$  ng/L;  $p < 0,001$ ) oraz w grupie z SNN ( $3242,0 \pm 205,61$  vs.  $7419,0 \pm 571,85$  ng/L;  $p < 0,001$ ). Natomiast średni poziom białka Klotho  $\alpha$  w surowicy wszystkich pacjentów z rakiem tarczycy ( $946,8 \pm 44,35$  ng/L) był istotnie niższy niż uzyskany w grupie chorych z SNN ( $1418,6 \pm 172,30$  ng/L;  $p < 0,01$ ) natomiast nie różnił się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną ( $815,2 \pm 79,46$  ng/L;  $p > 0,05$ ).

Stwierdzono istotnie statystycznie niższe średnie stężenie białka  $\beta$  Klotho w surowicy krwi pacjentów z rakiem brodawkowym ( $3964,5 \pm 288,64$  ng/L;  $p < 0,05$ ), pęcherzykowym ( $2222,1 \pm 338,02$  ng/L;  $p < 0,001$ ), rdzeniastym ( $2385,4 \pm 371,35$  ng/L;  $p < 0,001$ ) i anaplastycznym tarczycy ( $2645,8 \pm 347,67$  ng/L;  $p < 0,001$ ) w porównaniu z grupą z SNN ( $7419,0 \pm 571,85$  ng/L) oraz grupą kontrolną ( $7492,3 \pm 573,13$  ng/L).

Uzyskano istotnie statystycznie niższy poziom stężenia białka  $\alpha$  Klotho u pacjentów z rakiem brodawkowym ( $976,5 \pm 60,70$  ng/L;  $p < 0,01$ ), rdzeniastym ( $919,8 \pm 90,63$  ng/L;  $p < 0,01$ ) i anaplastycznym ( $729,4 \pm 60,46$  ng/L;  $p < 0,001$ ) w porównaniu z grupą z wolem guzkowym obojętnym ( $1418,6 \pm 172,30$  ng/L). Nie

stwierdzono natomiast istotnej różnicy między grupami z poszczególnymi typami raka a grupą kontrolną ( $815,2 \pm 79,46$  ng/L)

## **Wnioski**

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że:

1. Stężenie białka  $\beta$  Klotho w surowicy pacjentów z rakiem tarczycy jest znacznie niższe niż u pacjentów z łagodnymi chorobami tarczycy oraz u osób zdrowych
2. Brak jest istotnych różnic w stężeniu białka  $\beta$  Klotho u pacjentów z łagodnymi chorobami tarczycy i u osób zdrowych
3. Stężenie białka  $\alpha$  Klotho w surowicy pacjentów z rakiem tarczycy nie różniło się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną.

Na podstawie otrzymanych w mojej pracy wyników można wysunąć wniosek ogólny:

Oznaczanie stężenia białka  $\beta$  Klotho w surowicy może być przydatne w określaniu złośliwości nowotworów gruczołu tarczowego w diagnostyce przedoperacyjnej.

# Abstract

## Introduction

The most common neoplasm of the endocrine glands is thyroid cancer and it accounts for about 1-2% of all cancers. According to the data of the National Cancer Registry, thyroid cancer is diagnosed every year in over 4,000 people in Poland and its morbidity is constantly increasing. Currently, the basic pre-operative examination used in the diagnosis of thyroid cancer is fine-needle aspiration biopsy (FNAB). However, the limitations of this test mean that the result is not always diagnostic. Few markers of thyroid cancer are used. Thyroglobulin is used in the postoperative control of differentiated thyroid cancers, while calcitonin is used in medullary cancer. The  $\alpha$  and  $\beta$  Klotho proteins belong to the Klotho protein family. They are coreceptors for the growth factors of subfamily 19 fibroblasts, and therefore take part in the regulation of many processes important for the proper functioning of cells and tissues. Reports on the association of the  $\alpha$  and  $\beta$  Klotho proteins with solid tumors allow the use of these proteins in the diagnosis of thyroid cancer. The possibility of diagnosing thyroid cancer by means of preoperative determination of plasma markers will enable better diagnostics of thyroid tumors and facilitate the qualification of patients for radical surgery.

## Aim of study

The aim of the study was:

1. Determination of the concentration of proteins  $\alpha$  and  $\beta$  Klotho in the blood serum of patients with thyroid neoplasms (multinodular nontoxic goiter, papillary cancer, follicular cancer, medullary cancer, anaplastic cancer) compared to the control group (healthy individuals)

2. Assessment of the diagnostic usefulness of determining the concentration of these proteins as markers of malignancy of thyroid gland tumors depending on their type.

## **Materials and methods**

The study included patients qualified for elective thyroidectomy based on the diagnosis of thyroid cancer or suspected thyroid follicular neoplasm (Neoplasma folliculare) by fine-needle aspiration biopsy (FNAB). The study included 86 patients operated on in 2014-2019 at the Department of Endocrine and General Surgery of the Medical University of Lodz, from whom tissue material (blood) was taken.

Then the patients were assigned to one of the groups based on the results of postoperative tissue histopathology:

1. Patients with papillary cancer (PTC) - 36
2. Patients with follicular cancer (FTC) - 11
3. Patients with anaplastic cancer (ATC) - 9
4. Patients with medullary cancer (MTC) - 11
5. Patients with multinodular nontoxic goiter (MNG) - 19

The control group included 20 healthy volunteers who were excluded from any thyroid diseases based on clinical, laboratory (aTPO, aTG, TSH, fT3, fT4) and imaging (thyroid ultrasound) examinations.

Determination of the concentrations of the tested factors was carried out using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. All tests were performed in accordance with the manufacturer's instructions at the Department of

Immunoendocrinology at the Department of Endocrinology, Medical University of Lodz. All measurements were made in duplicate and averaged.

The Shapiro-Wilk test, ANOVA was used for statistical analysis. The comparison of the mean values of three or more study groups was performed using the analysis of variance (ANOVA) followed by the NIR test. The level of statistical significance was  $p < 0.05$ . All analyzes were performed using Dell Statistica PL v. 13.1 (StatSoft Polska).

## Results

The mean serum level of Klotho  $\beta$  protein in the group of all patients with thyroid cancer was significantly lower than that obtained in the controls ( $3242.0 \pm 205.61$  vs.  $7492.3 \pm 573.13$  ng / L;  $p < 0.001$ ) or MNG group ( $3,242.0 \pm 205.61$  vs.  $7,419.0 \pm 571.85$  ng / L;  $p < 0.001$ ). However, the mean serum level of Klotho  $\alpha$  in all thyroid cancer patients ( $946.8 \pm 44.35$  ng / L) was significantly lower than that obtained in the group of patients with MNG ( $1418.6 \pm 172.30$  ng / L;  $p < 0, 01$ ), however, did not differ significantly from the healthy controls ( $815.2 \pm 79.46$  ng / L;  $p > 0.05$ ).

The mean serum level of  $\beta$  Klotho protein in PTC, FTC, MTC and ATC patients ( $3964.5 \pm 288.64$  ng / L;  $2222.1 \pm 338.02$  ng / L;  $2385.4 \pm 371.35$  ng / L;  $2645.8 \pm 347.67$  ng / L) was significantly lower than that obtained in the MNG group ( $7419.0 \pm 571 85$  ng / L) or controls ( $7,492.3 573.13$  ng / L).

Similarly, the mean serum level of  $\alpha$  Klotho protein in PTC, MTC and ATC patients ( $976.5 \pm 60.70$  ng / L;  $919.8 \pm 90.63$  ng / L;  $729.4 \pm 60.46$  ng / L) was also lower than the MNG group ( $1418.6 \pm 172.30$  ng / L). However, there was no difference between the groups with particular types of cancer and the control group ( $815.2 \pm 79.46$  ng / L).



## Conclusions

Based on the obtained results, it can be concluded that:

1. The concentration of  $\beta$  Klotho protein in the serum of patients with thyroid cancer is much lower than in patients with mild thyroid disease and healthy people
2. There are no significant differences in the concentration of Klotho  $\beta$  protein in patients with mild thyroid disease and healthy people
3. The concentration of  $\alpha$  Klotho protein in the serum of patients with thyroid cancer did not differ significantly compared to the control group.

On the basis of the results obtained in my study, a general conclusion can be drawn:

Determination of the serum concentration of  $\beta$  Klotho protein may be useful in the detection of malignancy of thyroid gland neoplasms in preoperative diagnostics.