

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**др Олгица Михаљевић**

**ПРОМЕНЕ У АПОПТОЗИ ЛИМФОЦИТА, ПАРАМЕТРИМА  
ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА И ПРОФИЛУ ЦИТОКИНА КОД  
БОЛЕСНИКА СА ДИФЕРЕНТОВАНИМ КАРЦИНОМОМ  
ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ**

**докторска дисертација**

**Ментор: проф др Снежана Живанчевић Симоновић**

**Крагујевац, 2014.**

# **САДРЖАЈ**

## **1. УВОД**

### **1.1. Диферентовани карциноми штитасте жлезде**

#### **1.1.1. Етиопатогенеза диферентованих карцинома штитасте жлезде**

#### **1.1.2. Лечење пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде**

### **1.2. Оксидативни стрес у малигним болестима**

### **1.3. Микронуклеуси у малигним болестима**

### **1.4. Апоптоза лимфоцита у малигним болестима**

### **1.5. Цитокински профил у малигним болестима**

## **2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА**

## **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### **3.1. Испитивана популација**

### **3.2. Општи протокол истраживања**

### **3.3. Тиреоидни статус, концентрација тиреоглобулина и анти-тиреоидних аутоантитела**

### **3.4. Сцинтиграфија целог тела**

### **3.5. Параметри липидне пероксидације**

### **3.6. Тотални антиоксидативни статус**

### **3.7. Концентрација стандардних биохемијских параметара**

### **3.8. Одређивање фреквенце микронуклеуса**

### **3.9. Изолација мононуклеарних ћелија периферне крви**

### **3.10. Анализа субпопулација мононуклеарних ћелија периферне крви**

**3.11. Одређивање процента апоптотичних и некротичних ћелија у узорцима мононуклеарних ћелија периферне крви**

**3.12. Одређивање цитокинског профила**

**3.13. Статистичка обрада података**

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

**4.1. Карактеристике пацијената са DTC**

**4.2. Оксидативни стрес код пацијената са DTC**

**4.2.1. Концентрација MDA, мокраћне киселине и ниво тоталног антиоксидативног статуса**

**4.2.2. Однос оксидативног стреса, апликоване дозе <sup>131</sup>I и импулса детектованих гама камером**

**4.3. Протеински и липидни профил пацијената са DTC**

**4.4. Фреквенца микронуклеуса код пацијената са DTC**

**4.4.1. Микронуклеусна фреквенца и “cytokinesis-block” пролиферациони индекс (CBPI)**

**4.4.2. Однос микронуклеуса, апликоване дозе <sup>131</sup>I и импулса детектованих гама камером**

**4.5. Апоптоза и некроза лимфоцита периферне крви пацијената са DTC**

**4.5.1. Рана, касна апоптоза и некроза**

**4.5.2. Однос апоптозе и микронуклеусне фреквенце**

**4.6. Ћелије периферне крви пацијената са DTC**

**4.7. Цитокински профил код пацијената са DTC**

## **5. ДИСКУСИЈА**

**5.1. Оксидативни стрес код пацијената са DTC**

**5.2. Биохемијски параметри код пацијената са DTC**

**5.3. Фреквенца микронуклеуса код пацијената са DTC**

**5.4. Апоптоза код пацијената са DTC**

**5.5. Телије периферне крви код пацијената са DTC**

**5.6. Цитокински профил код пацијената са DTC**

**6. ЗАКЉУЧЦИ**

**7. ЛИТЕРАТУРА**

**8. ПРИЛОГ**

**8.1. Кључна документацијска информатика**

**8.2. Key words documentation**

**8.3. Биографски подаци аутора**

**8.4. Списак објављених радова**

**8.5. The list of published papers**

**8.6. Идентификациона страница докторске дисертације**

# 1. УВОД

## 1.1. Диферентовани карциноми штитасте жлезде

Карциноми штитасте жлезде чине око 1% свих малигних тумора (1). Реч је о најчесталијим туморима ендокриног система (око 95%) (2), чија се инциденца у току протеклих тридесетак година повећала у многим земљама (3). Тиреоидни карциноми могу бити пореклом од малигно измењених фоликуларних или нефоликуларних (парафоликуларних) тиреоидних ћелија. У карциноме фоликуларног порекла спадају папиларни, фоликуларни, анапластични и инсуларни тиреоидни карциноми, а у карциноме нефоликуларног порекла медуларни карцином (4).

Диферентовани карциноми штитасте жлезде (енгл. *differentiated thyroid cancers, DTC*) обухватају папиларне и фоликуларне карциноме и чине више од 90% свих тиреоидних тумора. Папиларни карциноми су најчесталији карциноми штитасте жлезде (> 70%) (5). Обично метастазирају лимфогено, при чему су латерални лимфни чворови захваћени код 51-100% пацијената (6). Постоји неколико варијанти папиларног карцинома штитасте жлезде: фоликуларна, дифузно-склерозирајућа варијанта, високоћелијска (*tall cell*) и цилиндрична ћелијска (*column cell*) варијанта (7).

Малигни епителни тумори са елементима диференцијације фоликуларних ћелија, али без дијагностичких особености папиларних карцинома, означени су као фоликуларни карциноми. Фоликуларни карциноми чине око 15% свих карцинома штитасте жлезде и сматрају се агресивнијим типом тумора. Фоликуларни карциноми се карактеришу васкуларном инвазијом и појавом удаљених метастаза, које се могу детектовати у моменту иницијалне дијагностике карцинома код 2-5% оболелих (8). Подтипови фоликуларног

карцинома су минимално инвазивна, широко инвазивна варијанта и карцином оксифилних ћелија (Hürthle cell карцином).

Ћелије диферентованих карцинома штитасте жлезде задржавају извесна биолошка својства нормалног тиреоидног ткива и, зависно од степена диференцијације, показују способност синтезе тиреоглобулина (Tg) и тиреоидних хормона, експресију рецептора за тиреостимулишући хормон (TSH) и учешће у метаболизму јода (9). Иако метаболизам јода у туморском ткиву карактерише смањење органификације и ефективног полуживота јода (10), TSH може стимулирати преузимање и концентрисање јода у туморском ткиву.

### **1.1.1. Етиопатогенеза диферентованих карцинома штитасте жлезде**

Излагање зрачењу, повећан/смањен унос јода, хронични лимфоцитни тиреоидитис, хормонски фактори, геномска нестабилност и позитивна породична историја представљају факторе ризика за настанак диферентованог карцинома штитасте жлезде. Зрачење се сматра једним од најважнијих етиолошких фактора за настанак DTC, нарочито папиларних карцинома (4). Ризик од појаве карцинома штитасте жлезде зависи од дозе јонизујућег зрачења и најизраженији је у дечјем узрасту. Латентни период од експозиције до настанка карцинома може трајати и неколико десетина година, а најкритичнијим периодом за појаву малигнитета сматра се време од 20-30 година по експозицији (11).

Прогноза болести углавном је добра, преко 90% пацијената преживи 10 година од постављања дијагнозе. Прогностички фактори укључују карактеристике самих пацијената (прогноза је лошија код особа старијег животног доба, мушког пола и позитивне породичне анамнезе), хистолошки тип тумора (лошија је прогноза код *tall* и *column cell* варијанте папиларног карцинома, широко инвазивног фоликуларног и анапластичног карцинома), раст тумора (лошија је прогноза код особа са инвазивним туморима који се

шире ван капсуле штитасте жлезде и туморима који метастазирају билатерално у регионалне нодусе или дају удаљене метастазе) и стадијум болести (12).

Одређивање стадијума болести заснива се на TNM класификацији и подацима о величини и екстензивности примарног тумора (T) ( $T1 \leq 1$  cm;  $1$  cm  $< T2 \leq 4$  cm;  $T3 > 4$  cm; T4 директна инвазија тиреоидне капсуле), стању лимфних нодуса (N) (лимфни нодуси нису захваћени (N0) и регионални лимфни нодуси су захваћени (N1)), и метастатским променама (M) (одсуство метастаза (M0) или присуство метастаза (M1)).

### **1.1.2. Лечење пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде**

Основна терапија код пацијената са DTC је тотална или скоро тотална (енгл. *near total*) тиреоидектомија и дисекција регионалних лимфних нодуса ако су метастазе присутне, или постоји висок ризик за појаву метастаза (13). С обзиром на то да DTC ћелије могу да акумулирају јод, постоперативно се код већине пацијената примењују велике дозе радиоактивног јода ( $^{131}\text{I}$ ), са циљем да се  $^{131}\text{I}$  акумулира у штитастој жлезди и проузрокује потпуну елиминацију постоперативно заосталог тиреоидног ткива и јодавидних метастаза (14).

Терапија радиоактивним јодом подразумева системску администрацију  $^{131}\text{I}$  (15). Употреба  $^{131}\text{I}$ , чије је време полураспада од 8.02 дана (15), заснива се на емисији високоенергетског  $\beta$ -зрачења, просечне енергије од 191 keV (9) које изазива радијационо оштећење тиреоидних ћелија. Поред емисије  $\beta$ -честица (90% терапијског ефекта  $^{131}\text{I}$ ), атом  $^{131}\text{I}$  емитује и  $\gamma$ -зрачење (10% терапијског ефекта  $^{131}\text{I}$ ). Просечан домет  $\beta$ -честица у ткиву је 0.8 mm, максималан 2 mm, а величина функционалног оштећења ћелија пропорционална је апсорбованој дози (16).

Терапија  $^{131}\text{I}$  се сматра оптималном код пацијената са туморима већих димензија ( $> 1.5\text{cm}$ ), код хистолошки агресивних подтипова тумора, у случају присуства нодалних и/или удаљених метастаза, код особа са мултифокалном болешћу, код екстратиреоидне или васкуларне инвазије (13). Доза  $^{131}\text{I}$  која се примењује код пацијената са ДТС зависи од количине постоперативно заосталог ткива у тиреоидној ложи, и креће се у распону од 2.7 до 5.5 GBq. Веће дозе се препоручују уколико постоје метастазе у регионалним и медијастиналним лимфним нодусима (5.5 до 7.4 GBq), односно удаљене метастазе ( $> 7.4$  GBq) (48).

Радиоактивни  $^{131}\text{I}$  апликује се 4-6 недеља након операције, и уколико постоји потреба, може се понављати на сваких 6 месеци (17). Да би се интензивирала апсорпција  $^{131}\text{I}$  у тиреоидном ткиву, неопходно је да ниво TSH у серуму буде  $> 30$  mIU/L. Уколико се  $^{131}\text{I}$  апликује 4 до 6 недеља после тиреоидектомије, од операције до апликације аблационе дозе радиоактивног  $^{131}\text{I}$  не уводи се супституциона терапија препаратима L-тироксина, а уколико је период од операције до апликације  $^{131}\text{I}$  дужи, постоперативно се уводи супституциона терапија и обуставља 4-6 недеља пре апликације  $^{131}\text{I}$ . На тај начин се постиже стимулација секреције ендогеног TSH (18), који је потребан за бољу акумулацију  $^{131}\text{I}$  у нормалном или малигно измењеном тиреоидном ткиву. Осим стимулације секреције ендогеног TSH, акумулација  $^{131}\text{I}$  у тиреоидном ткиву може се стимулирати и применом егзогеног, хуманог рекомбинантног TSH (19). Неопходно је да две недеље пре апликације  $^{131}\text{I}$  пацијенти буду на дијети која је сиромашна јодом, а лекови који садрже јод или утичу на преузимање јода треба искључити из терапије пар недеља или месеци пре аблације, у зависности од степена утицаја на метаболизам јода (20).



Након тоталне тиреоидектомије, у серуму пацијената са DTC одређује се концентрација тиреоглобулина (Tg), специфичног туморског маркера за диферентоване карциноме штитасте жлезде. Детекција Tg код особа код којих је урађена тотална тиреоидектомија указује на присуство ткива које лучи Tg (резидуални тиреоидни карцином, локалне или удаљене метастазе тиреоидног карцинома или нормално тиреоидно ткиво). Осим масе тиреоидног ткива (бенигног или малигног), на концентрацију Tg у серуму утичу и интензитет стимулације преко рецептора за TSH, као и способност туморских ћелија да синтетишу и луче Tg (21). Администрација 131-I код пацијената са DTC повећава осетљивост и специфичност накнадних мерења концентрације Tg, а касније повећање серумске концентрације Tg указује на појаву рецидива тиреоидног карцинома.

## **1.2. Оксидативни стрес у малигним болестима**

Оксидативни стрес је поремећај у којем продукција слободних радикала превазилази капацитете биолошког система за њихову елиминацију, што за последицу може имати оштећење ћелија или ћелијску смрт (22). Слободни радикали су молекули/делови молекула који имају један или више неспарених електрона у спољашњем електронском омотачу. Неспарени електрони представљају слободне валенције, и узрок су високе и неселективне реактивности слободних радикала (23). Слободни радикали настају током оксидативне фосфорилације, у току фагоцитозе (у фагоцитним ћелијама), или могу бити узроковани дејством егзогених фактора, укључујући и јонизујуће зрачење (24).

Слободни радикали обухватају реактивне облике кисеоника (енг. Reactive Oxygen Species – ROS), реактивне облике азота (енг. Reactive Nitrogen Species - RNS) и слободне радикале хлора.

Коначни ефекти деловања слободних радикала зависе од одбрамбених способности организма. Физиолошки заштитни механизми су антиоксиданси, антиоксидативни ензими и неензимски антиоксиданси (тзв. „хватачи” слободних радикала, укључујући и мокраћну киселину) (25,26). Антиоксиданси делују на више начина: блокирањем иницијалног формирања радикала, уклањањем већ формираних радикала и поправком радикалима-индукованих оштећења у ћелији (27).

Деценијама уназад научници су се бавили проучавањем појединачних антиоксиданаса (28), занемарујући чињеницу да њихови ефекти могу бити адитивни. Потпуни увид у стање очуваности оксидо-редукционе равнотеже остварује се проценом тоталног антиоксидативног статуса (TAS) тј. мерењем свеукупне активности различитих антиоксиданаса (29). Низак тотални антиоксидативни статус указује на повећану осетљивост на дејство фактора који проузрокују оксидативно оштећење (30).

Најизраженија, и најбоље проучена штетна последица дејства слободних радикала је липидна пероксидација. Липидна пероксидација подразумева аутокаталитички, прогредијентан и најчешће иреверзибилан процес оксидације полинезасићених масних киселина у ћелијским мембранама, при чему долази до поремећаја у њеној грађи и функцији. Последица насталих промена је руптура мембране, ослобађање лизозомских ензима и смрт ћелије (31). У липидној пероксидацији настаје велики број цитотоксичних, примарних и секундарних оксидативних продуката: коњуговани диени, малондиалдехид (MDA), F2-изопропан и 4-хидроксиноненал (32).

Степен оштећења биолошких структура изазван липидном пероксидацијом у *in vivo* и *in vitro* условима процењује се спектрофотометријским мерењем концентрације MDA са тиобарбитуратном киселином (33). MDA је стабилан продукт липидне пероксидације који може реаговати са слободним аминок групама протеина и нуклеинских киселина доводећи

до нових оштећења ћелије. Другим речима, MDA се користи као биолошки маркер оксидативног стреса (34).

До сада су многи аутори показали да код пацијената са различитим врстама карцинома постоји повећан оксидативни стрес (35,36) и смањен антиоксидативни капацитет плазме (37,38). Претпоставка је да ћелије карцинома продукују слободне радикале у мери која није довољна да индукује њихову смрт (39).

У ћелијским линијама различитих хуманих карцинома (малигног меланома, карцинома колоне, неуробластома, карцинома дојке и јајника) показана је повећана продукција водоник пероксида која није индукована егзогеним факторима (40). С друге стране, експресија гена за антиоксидативне ензиме редукована је у ћелијама неких карцинома (41). Otto von Warburg поставио је хипотезу да повећана продукција слободних радикала у ћелијама карцинома настаје због дисфункције митохондрија, а да интензиван оксидативни стрес настаје као последица поремећаја респираторне функције митохондрија и инхибиције комплекса IV (цитохром „с“) у респираторном ланцу (42), што потврђују резултати недавно публикованих студија (43,44). Поремећај функције митохондрија последица је мутација митохондријалне ДНК и гена који кодирају компоненте респираторног ланца, чије је присуство показано код карцинома главе, плућа, желуца, леукемија и лимфома (45).

Свакако да повећању оксидативног стреса доприноси и хронична инфламација, која се јавља код пацијената са узнапредовалим туморима (46), као и повећање ROS-генеришуће активности леукоцита периферне крви (47).

Када је у питању ефекат радиотерапије на оксидативни стрес, у неким студијама је показано да радиотерапија води повећању оксидативног стреса код пацијената са карциномом (48-50), док је у другим показано његово смањење (51,52). Те студије су указале на различит одговор појединих антиоксиданаса на радиотерапију.

Примена радиотерапије код пацијената оболелих од карцинома може интензивирати оксидативни стрес исцрпљивањем ендогених резерви антиоксиданаса (53). С обзиром на то да јонизујуће зрачење индукује стварање слободних радикала (54,55), крајњи ефекат зависи од концентрације антиоксиданаса на месту продукције слободних радикала, брзине настанка слободних радикала, као и од њихове интеракције са критичним биомолекулима (56).

### **1.3. Микронуклеуси у малигним болестима**

Цитолошка последица хромозомских аберација насталих деловањем различитих штетних (анеугених и кластогених) агенаса је формирање микронуклеуса (MN) (57). Микронуклеуси представљају фрагменте хромозома или целе хромозоме који су издвојени у току митозе и у цитоплазми ћерки ћелија уочавају се као мало, додатно једро (58,59). Неки MN могу потицати од фрагмената насталих ломљењем анафазних мостова услед хромозомских реаранжмана као што су дицентричне хроматиде, прстенасти хромозоми или групе сестринских хроматида (60).

Прва истраживања микронуклеуса у хуманим лимфоцитима периферне крви вршили су Fenech и Morley применом цитокинезис-блок микронуклеус теста (CBMN) (61), који представља једну од најбољих цитогенетских метода за процену оштећења ДНК. CBMN тест пружа могућност процене генотоксичног и мутагеног потенцијала различитих физичких и хемијских фактора (62).

Међутим, микронуклеуси нису само биомаркери хромозомског оштећења, већ они одражавају и општу геномску нестабилност (63). Очуваност интегритета генома је од пресудног значаја за нормално функционисање ћелија, а његово нарушавање повезано је са настанком ћелијске смрти и/или малигном трансформацијом ћелије (64).

Резултати многих студија указују на то да постоји директна повезаност између појаве карцинома и постојања геномске нестабилности (65,66), као и да се у ћелијама са нестабилним кариотипом хромозоми уклањају стварањем микронуклеуса (67). О томе сведочи висока учесталост микронуклеуса код пацијената оболелих од карцинома, постојање корелације између MN-индукујућих генотоксичних агенаса и канцерогенезе, и инверзна корелација између MN фреквенце и концентрације појединих микроелемената који смањују ризик од настанка карцинома (68).

Iarugsovai и сарадници су показали да постоји директна повезаност између MN фреквенце (која одражава геномску нестабилност) и склоности ка настанку карцинома (69). Повећана фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви утврђена је код нелечених пацијената са карциномом главе и врата, плућа, дојке, материце и једњака (69-72).

Код пацијената са карциномом радиотерапија води додатном повећању фреквенце микронуклеуса (73). Јонизујуће зрачење углавном делује као снажан кластогени фактор и индукује настанак микронуклеуса од ацентричних фрагмената хромозома (74,75), а у мањој мери изазива анеуплоидију и дислокацију целих хромозома из деобеног вретена (76). Зрачење проузрокује настанак хромозомских аберација, грешке у репликацији ДНК молекула и изостанак репарације насталих оштећења, што води стварању MN (77). Коначни ефекат зрачења зависи од грешака у грађи ДНК молекула и репарационог капацитета ћелија, који је значајно редукован код особа оболелих од карцинома (78).

#### **1.4. Апоптоза лимфоцита у малигним болестима**

Апоптоза је процес програмиране ћелијске смрти којим се елиминишу ћелије како у физиолошким, тако и у неким патолошким условима. Типичне морфолошке промене код апоптотичних ћелија су смањење запремине цитоплазме, фрагментисање у више

апоптотских телашаца, и фагоцитоза од стране околних ћелија (79,80). У раној фази апоптозе долази до измештања фосфатидилсерина са унутрашње на спољашњу површину ћелијске мембране, чиме се омогућава неинфламаторно препознавање апоптотичних ћелија од стране фагоцита (81,82), а у каснијем стадијуму долази до губитка интегритета ћелијске мембране (83).

С обзиром на то да апоптоза представља основни биолошки механизам којим се остварује ткивна хомеостаза (84), укључена је у процесе ембриогенезе, метаморфозе, ремоделовања ткива и имунског одговора. С друге стране, поремећаји регулације апоптозе могу бити укључени у патогенезу многих болести, као што су, на пример, малигне, аутоимунске и неуродегенеративне болести (85). Поред тога, неадекватно функционисање апоптотског апарата може проузроковати мутације гена који су директно или индиректно укључени у различите стадијуме апоптозе (86).

Спонтана *ex vivo* апоптоза лимфоцита периферне крви до сада је проучавана код пацијената са карциномом главе и врата (87), дигестивног тракта (88) и репродуктивног система (89,90), карциномом дојке (91), меланомом (92) и мултиплим мијелом (93). Неке од поменутих студија указале су на то да код пацијената са различитим типовима карцинома (87,91,92) постоји већа заступљеност апоптотичних ћелија међу лимфоцитима периферне крви. Механизам одговоран за повећање степена спонтане апоптозе још увек је недовољно испитан. Једно од могућих објашњења је интензивирање Fas (APO-1, CD95)/FasL спољашњег пута активације апоптозе. Значајан број циркулишућих лимфоцита се код пацијената са карциномом главе и врата уклања процесом апоптозе, а ти лимфоцити су Fas-позитивни (87). Такође, показано је да ћелије карцинома појачано експримирају Fas лиганд (94). Изгледа да Fas/FasL активишући пут, укључујући и присуство серумског Fas лиганда, може бити укључен у индукцију процеса апоптозе у циркулишућим лимфоцитима.

Осим поменутог, постоји још пар механизма који би могли да буду укључени у индукцију апоптозе код пацијената са туморима, као што су присуство дивљег соја p53 гена, активација c-тус гена, прекомерна експресија проапоптотичних молекула Вах или Вак, и промене у продукцији цитокина (смањење концентрације IL6, IL10, INF- $\gamma$ , односно повећање концентрације TNF- $\alpha$ ) (95,96).

Примена радиотерапије интензивира апоптозу лимфоцита код особа са различитим врстама тумора (97,98) деловањем на ћелијску мембрану и на генетски материјал. Први механизам подразумева разградњу мембранског сфингомијелина уз формирање церамида, стимулатора интерфазне смрти ћелије. Други механизам заснива се на радијационом оштећењу ДНК, које је праћено повећањем p53-зависне транскрипције и блокадом убиквитин-зависне разградње протеина, што такође индукује апоптозу (99).

## **1.5. Цитокински профил у малигним болестима**

Још су Mosmann и Coffman 1989. године претпоставили да CD4+ Т лимфоцити нису јединствени, већ да се састоје од ћелијских популација које преодоминантно секретују одређене цитокине и имају различите функције. Они су показали да се CD4+ Т-ћелијске линије могу поделити у 2 групе, од којих једна група као главни цитокин продукује интерферон гама (IFN- $\gamma$ ), а друга интерлеукин 4 (IL-4). Тиме су дефинисали два фенотипа CD4+ Т лимфоцита, Th1 и Th2 (100), при чему обе субпопулације настају из наивних CD4+ Т лимфоцита (Th0), чија је судбина детерминисана почетном интеракцијом са антигеном на мембрани антиген-презентујуће ћелије и цитокинима који су присутни у околној микросредини. Данас се CD4+ Т лимфоцити углавном деле на четири субпопулације, и то: Th1, Th2, Th17 и регулаторне Т (Treg) лимфоците (101-105).

Субпопулација Th1 лимфоцита преодоминантно секретује IFN- $\gamma$  и има важну улогу у имунском одговору против интраћелијских патогена, а субпопулација Th2 лимфоцита

секретује интерлеукин 4 (IL-4), интерлеукин 5 (IL-5), интерлеукин 13 (IL-13) и интерлеукин 25 (IL-25), и укључена је у елиминацију екстраћелијских патогена и паразита.

Субпопулација Th17 ћелија лучи интерлеукин 17 (IL-17), интерлеукин 21 (IL-21) и интерлеукин 22 (IL-22) и има важну улогу у настанку ткивне инфламације и аутоимунских болести, док субпопулација регулаторних Т лимфоцита (Treg) продукује цитокине који инхибишу имунски одговор, као што су интерлеукин 10 (IL-10) и трансформишући фактор раста бета (TGF- $\beta$ ).

Полазећи од идеје Mosmanna и Coffmana, Kidd (101) је претпоставио да у физиолошким условима у организму постоји избалансиран однос Th1 и Th2 лимфоцита, а да прекомерна активност једне субпопулације ћелија може омогућити развој болести, и уједно довести до нисходне регулације друге субпопулације лимфоцита, пре свега продукцијом контрарегулаторних цитокина. Истовремено, цитокини Th1 или Th2 типа усмеравају сопствени пут развоја продукцијом цитокина, регулацијом нивоа мембранских рецептора и нивоа експресије транскрипционих фактора (102).

С обзиром на велики капацитет синтезе и секреције интерлеукина 12 (IL-12), дендритичне ћелије имају изузетно важну улогу у усмеравању наивних, CD4+ Th0 лимфоцита у Th1 лимфоците, док одсуство IL-12 и ослобађање IL-4, а према новијим сазнањима и IL-33, фаворизује настанак Th2 лимфоцита.

У процесу функционалне поларизације наивних CD4+Т лимфоцита у Th1 и Th2 субпопулацију, дендритичне ћелије такође постају поларизоване (103). При том на процес поларизације не утичу само цитокини и хемокини, већ и простагландини (PGE2), као и други медијатори запаљења произведени од стране макрофага, фибробласта, епителних и туморских ћелија. Наивне дендритичне ћелије изложене високим концентрацијама IFN $\gamma$  (продукованог од стране активираних НК ћелија и Th1 лимфоцита) могу постати дендритичне ћелије типа 1, које обилно производе IL-12, и омогућавају развој Th0 у Th1



лимфоците, док дендритичне ћелије изложене релативно високим концентрацијама PGE2 поларишу у дендритичне ћелије тип 2 (104).

Супресија продукције IL-12 у туморској микросредини повезује се са смањењем активности Th1 лимфоцита код особа са туморима. С обзиром на то да цитокини Th1 лимфоцита активишу цитотоксичне Т лимфоците, НК ћелије, макрофаге, моноците, и друге ћелије које могу бити укључене у борбу против тумора, а да је концентрација IFN $\gamma$  и других Th1 цитокина обично снижена код пацијената са узнапредовалим карциномима, при чему концентрација IL-4 може бити повећана или непромењена (105), то указује на смањење активности Th1 лимфоцита код особа са туморима. Пошто IL-10 супримира лучење Th1 цитокина, а повећана концентрација IL-10 детектована је код особа са лимфомом, карциномом јајника, меланомом, неуробластомом, и карциномом дебелог црева (104), то би могао да буде механизам којим се кочи Th1 тип имунског одговора који је усмерен према тумору. Осим тога, у присуству IL-4 у туморским ћелијама може настати усходна регулација IL-10, за који је показано да делује супресивно на ћелије убице из окружења (106).

Улога Th17 лимфоцита у имунском одговору на туморе још увек је недовољно расветљена, а подаци у до сада публикованим радовима контраверзни (107,108). Према резултатима Крусек и сарадника, број Th17 лимфоцита у туморској микросредини пропорционалан је броју CD4<sup>+</sup> Th1 лимфоцита, цитотоксичних CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и НК ћелија, а обрнуто пропорционалан броју регулаторних Т лимфоцита (109). Th17 лимфоцити код пацијената са туморима продукују фактор који стимулише раст колонија гранулоцита и макрофага, фактор некрозе тумора алфа (TNF $\alpha$ ), IL-2 и IFN $\gamma$ , а не продукују IL-10 (109). Просечно преживљавање пацијентиња са оваријалним карциномом код којих је у асциту детектована висока концентрација интерлеукина 17 (IL-17) је боље (78 месеци) од пацијенткиња код којих је концентрација IL-17 у асциту мања (27 месеци)

(108). Насупрот томе, код пацијената са хормон-резистентним карциномом простате показана је обрнута корелација између нивоа циркулишућих Th17 лимфоцита и прогресије болести (110), а код пацијената са назофарингеалним карциномом број тумор-инфилтришућих Th17 лимфоцита није утицао на преживљавање пацијената (111).

Регулаторни Т лимфоцити (Treg) се могу поделити на урођене и адаптивне (индуцибилне). За деловање урођених Treg потребан је директан контакт, док адаптивни Treg ослобађају имуносупресивне цитокине: IL-10 и трансформишући фактор раста бета (TGF $\beta$ ) (112). Повећање броја Treg лимфоцита подстиче стварање имуносупресивне микросредине (113) и повезано је са напредовањем болести (114), док уклањање Treg лимфоцита појачава имунски одговор на туморске ћелије (115). Повећан број Treg лимфоцита показан је у периферној крви пацијената са карциномом дојке, јетре, желуца и једњака, односно у инфилтрату бројних тумора (јајника, јетре, желуца и једњака, микроцелуларног карцинома плућа, панкреаса и тумора главе и врата), што је детаљно приказано у ревијском раду Радосављевић и сарадника (112). Међутим, осим имуносупресивног, код особа са туморима Treg лимфоцити могу имати и проинфламаторно дејство. Наиме, TGF $\beta$  ослобођен од стране Treg лимфоцита може индуковати стварање Th17 лимфоцита, или се Treg лимфоцити могу трансформисати у Th17 лимфоците (116).

Актуелна сазнања о ефектима зрачења на поларизацију CD4+ Т лимфоцита заснована су на анималним моделима. Примена јонизујућег зрачења изазива диференцијацију наивних CD4+ Т лимфоцита у Th2 правцу и секрецију цитокина Th2 типа (117-119). Bass и сарадници су показали да зрачење код мишева нарушава равнотежу између Th1 и Th2 лимфоцита и смањује однос између те две субпопулације ћелија (Th1/Th2) (120). Једна могућност је да зрачење инхибира активацију Th1 лимфоцита инхибицијом продукције IL-12 од стране антиген презентујућих ћелија, смањењем секреције биолошки активног IL-12

и нисходном регулацијом експресије рецептора за IL-12 на површини CD4+ Т лимфоцита (117). С друге стране, повећава се продукција IL-4, а сматра се да је IL-4 главни покретач пострадијационе запаљењске реакције (121). У раним фазама након озрачивања главни извор IL-4 су Th2 лимфоцити (122), док касније вероватно настаје активација и других IL-4 продукујућих ћелија, пре свега макрофага (122) и мастоцита (123).

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ овог истраживања био је да се испитају целуларне и биохемијске промене у периферној крви пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде пре и седам дана након апликације радиоактивног  $^{131}\text{I}$ .

У складу са основним циљем поставили смо следеће специфичне задатке:

1. Испитати да ли између групе пацијената са DTC пре апликације  $^{131}\text{I}$  и контролне групе здравих испитаника постоје разлике у:
  - 1.1 фреквенци микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви
  - 1.2 броју ћелија периферне крви и процентуалној заступљености лимфоцитних субпопулација (CD3+ Т лимфоцита, CD19+ В лимфоцита, и CD56+ NK ћелија)
  - 1.3 проценту апоптотичних лимфоцита,
  - 1.4 концентрацији биохемијских параметара (протеина, холестерола и триглицерида)
  - 1.5 концентрацији одабраних цитокина (интерферона гама (IFN- $\gamma$ ), интерлеукина 1 бета (IL-1 $\beta$ ), интерлеукина 2 (IL-2), интерлеукина 4 (IL-4), интерлеукина 5 (IL-5), интерлеукина 6 (IL-6), интерлеукина 9 (IL-9), интерлеукина 10 (IL-10), интерлеукина 12 (IL-12p70), интерлеукина 13 (IL-13), интерлеукина 17 (IL-17A), интерлеукина 22 (IL-22) и фактора некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ )) мерених у серуму и у супернатанту фитохемаглутитинином стимулираних ћелија у култури пуне крви *in vitro*.

2. Испитати да ли између групе пацијената са DTC пре и седам дана након апликације

131-I постоје разлике у:

2.1 фреквенци микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви

2.2 броју ћелија периферне крви и процентуалној заступљености лимфоцитних субпопулација (CD3+ Т лимфоцита, CD19+ В лимфоцита, и CD56+ NK ћелија)

2.3 проценту апоптотичних лимфоцита,

2.4 концентрацији биохемијских параметара (протеина, холестерола и триглицерида)

2.5 концентрацији цитокина Th1/Th2/Th17 помоћничких субпопулација Т лимфоцита: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-22, TNF- $\alpha$  мерених у серуму и у супернатанту фитохемаглутитинином стимулираних ћелија у култури пуне крви *in vitro*

3. Испитати да ли промене у периферној крви пацијената са DTC седам дана након апликације 131-I зависе од:

3.1 апликоване дозе (3.7 GBq или 5.5 GBq 131-I)

3.2 ретенције 131-I у телу пацијента (у целом телу, тиреоидном и абдоминалном региону од интереса)

3.3 интензитета измереног оксидативног стреса.

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

Истраживање представља компаративну клиничко-експерименталну студију у којој су вредности тестираних параметара упоређиване између експерименталне групе пацијената са DTC и контролне групе здравих испитаника, као и између пацијената са DTC после апликације радиоактивног  $^{131}\text{I}$  и истих пацијената пре апликације  $^{131}\text{I}$ . Целокупно истраживање спроведено је у Центру за нуклеарну медицину, Хематолошкој лабораторији и Централној лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу, Лабораторији за генетичка испитивања Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду. Истраживање је одобрено од стране Етичког комитета Клиничког центра у Крагујевцу (број 01-5868), који се у свом раду придржава правила Добре клиничке праксе (Good Clinical Practice, GCP). Сви пацијенти и контролни испитаници дали су писану сагласност за учешће у студији, сагласно Хелсиншкој Декларацији.

#### **3.1. Испитивана популација**

У студију је укључено 24 пацијента (16 жена и 8 мушкараца) код којих је урађена тотална тиреоидектомија, а патохистолошки је потврђена дијагноза добродиферентованог тиреоидног карцинома (папиларни или фоликуларни карцином). Након одговарајуће конзилијарне одлуке, пацијенти су упућени у Центар за нуклеарну медицину Клиничког центра Крагујевац ради апликације радиоактивног  $^{131}\text{I}$ . Просечна старост испитаника била је  $50.83 \pm 13.22$  година (најмлађи пацијент имао је 20, а најстарији 76 година).

Код 17 (70.83%) пацијената постављена је дијагноза папиларног карцинома, код 6 (25%) дијагноза фоликуларне варијанте папиларног карцинома, док је један испитаник (4.17%) имао фоликуларни карцином штитасте жлезде. Метастатске промене (у лимфним нодусима, плућима или костима) биле су присутне код 11 пацијената.

Четири до шест недеља после тоталне тиреоидектомије, и 10 дана након дијете сиромашне јодом, пацијентима је у Центру за нуклеарну медицину апликована аблациона доза радиоактивног натријум јодида ( $^{131}\text{I}$ ) сходно EANM водичу (15), и то 3.7 GBq (100 mCi) (13 пацијената) или 5.5 GBq (150 mCi) (11 пацијената). Код свих пацијената је, у време апликације  $^{131}\text{I}$ , серумска концентрација тиреостимулишућег хормона (TSH) била већа од 30 mIU/L. При том, ни један од пацијената није био изложен познатим изворима јонизујућег зрачења (радиолошка испитивања или сцинтиграфија) најмање три месеца пре апликације  $^{131}\text{I}$ . Четрнаест DTC пацијената дало је позитиван анамнестички податак о пушењу, док су преосталих десеторо били непушачи. У истраживање нису били укључени испитаници: млађи од 18 година, пацијенти са акутним инфекцијама (до месец дана пре апликације  $^{131}\text{I}$ ), пацијенти са раније дијагностификованим и/или леченим аутоимунским болестима, пацијенти са раније дијагностификованим и/или леченим хроничним инфламаторним болестима, и пацијенти са раније дијагностификованим и/или леченим другим малигним туморима.

Контролну групу испитаника чинило је 24 здрава добровољца, 19 (79.16%) жена и 5 (20.84%) мушкараца просечне старости  $46.37 \pm 12.79$  година (од 28 до 70 година), који нису имали раније дијагностификоване туморе или хроничне инфламаторне болести, и који месец дана пре узимање узорка крви нису имали акутну инфекцију са повишеном температуром, а најмање три месеца нису били изложени дејству јонизујућег зрачења у дијагностичке или терапијске сврхе. Код свих контролних испитаника, пре укључења у студију, одређена је концентрација тиреоидних хормона, TSH и анти-тиреоидна антитела,

аутоантитела на тиреоглобулин (TgAt) и аутоантитела на тиреоидну пероксидазу (TPOAt). Просечна концентрација TSH била је  $1.50 \pm 0.67$  mIU/L (0.4-3.5 mIU/L), док су анти-тиреоидна антитела код свих контролних испитаника била у опсегу референтних вредности.

### **3.2. Општи протокол истраживања**

Узорци периферне крви су испитаницима из контролне групе узимани само једном, док су пацијентима са DTC узимани у три наврата: непосредно пре апликације 131-I (0. дан), три дана после апликације 131-I (3. дан) и недељу дана после апликације 131-I (7. дан). Свим испитаницима је венепункцијом узимано по 5 mL крви у епрувете које нису садржале антикоагуланс и још по 10 mL крви у епрувете са антикоагулансом (хепарином). После 30 минута, из узорака крви без антикоагуланса издвајани су серуми (центрифугирањем на 2000 обртаја/мин у трајању од 15 минута), након чега су замрзавани и чувани на  $-20^{\circ}\text{C}$  до извођења одговарајућег есеја.

Спонтана апоптоза лимфоцита изолованих из пуне хепаринизиране крви одређивана је код пацијената са DTC пре и седам дана након апликације 131-I (0. и 7. дан). И фреквенца микронуклеуса анализирана је пре и седам дана након апликације 131-I (0. и 7. дан), засејавањем пуне хепаринизиране крви у комплетни медијум за култивацију лимфоцита. У групи контролних испитаника спонтана апоптоза лимфоцита периферне крви и фреквенца микронуклеуса одређивана је само једном.



## Методе

### 3.3. Тиреоидни статус, концентрација тиреоглобулина и анти-тиреоидних аутоантитела

Концентрација слободног тироксина (fT4), слободног тријодтирониона (fT3), тиреоглобулина (Tg), анти-тиреоглобулинских аутоантитела (TgAt) и аутоантитела на тиреоидну пероксидазу (TPOAt) одређивана је пре апликације <sup>131</sup>I применом стандардних дијагностичких тестова фирме *Cis Biointernational* (Француска) према упутству произвођача. Концентрација тиреостимулишућег хормона (TSH) одређивана је пре апликације <sup>131</sup>I применом стандардног дијагностичког теста фирме ИНЕП (Земун, Србија). Опсег референтних вредности за наведене параметре је: fT4 7-18 pg/mL, fT3 2-4.25 pg/mL, Tg 0-50 ng/mL, TgAt 0-30 IU/ mL, TPOAt 0-70 IU/ mL и TSH 0.3-5.5 mIU/L.

### 3.4. Сцинтиграфија целог тела

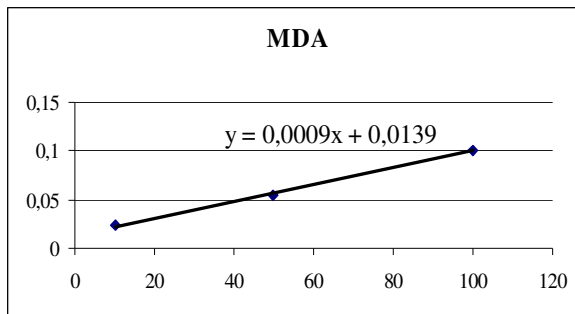
Сцинтиграфија целог тела (енгл. whole body) урађена је код свих пацијената 72h након апликације дозе <sup>131</sup>I на гама камери „SIEMENS e.cam Duall Head“ са колиimatorима за високу енергију (енгл. high energy), брзина скена 6 cm/min. Региони од интереса: регион тиреоидног остатка (без плувачних жлезда), и регион абдомена (без мокраћне бешике) исцртавани су у пратећем софтверском пакету (Syngo MI Applications 2009A ver:8.2.26.8\_VE32B16P30 IR26.5), у антериорно-постериорном (АП) и постериорно-антериорном (ПА) положају. Детектована радиоактивност приказана је као просечна радиоактивност, и то: укупна просечна радиоактивност и просечна радиоактивност

детектована у регионима од интереса (предео тиреоидне ложе и абдомена), добијене као средње вредности броја импулса забележених гама камером у АП и ПА позицији.

### 3.5. Параметри липидне пероксидације

Интензитет липидне пероксидације одређиван је мерењем концентрације малондиалдехида (MDA) уз помоћ тиобарбитуратне киселине (ТВА) (125). При ниским рН вредностима и повишеној температури MDA, који је крајњи продукт липидне пероксидације, учествује у реакцијама нуклеофилне адиције са 2-тиобарбитуратном киселином, при чему настаје црвени коњугат са високом моларном апсорпцијом на 532 nm, апсорпционог коефицијента  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Концентрација MDA код здравих испитаника одређивана је једнократно, а код пацијената са DTC у три наврата (пре апликације 131-I, три и седам дана након апликације 131-I). Једна запремина узорка серума мешана је са две запремине ТВА реагенса, справљеног од 15% трихлорсирћетне киселине, 0.375% тиобарбитуратне киселине и 0.25 M хлороводоничне киселине. Добијена мешавина загревана је 5 минута у купатилу са кључалом водом. Након хлађења, супернатант је одвојен центрифугирањем на 1000 g у трајању од 10 мин, при температури од +4°C, после чега је у издвојеним супернатантима спектрофотометријски (на 535 nm) мерена апсорбанца. За израчунавање концентрације MDA коришћена је стандардна крива конструисана на основу познатих концентрација стандарда 1,1,3,3-тетраметоксипропана. Конструисана стандардна крива проверена је статистичком методом линеарне регресионе анализе, при чему је добијена једначина праве  $y = 0,0009 + 0.0139x$ .



Слика 3.1. Стандардна крива за израчунавање концентрације MDA

### 3.6. Тотални антиоксидативни статус

Тотални антиоксидативни статус (TAS) мерен је аутоматски, на Olympus AU 400 анализатору. За анализу је коришћен комерцијални TAS есеј (Fortress Diagnostics, UK). Принцип есеја заснива се на способности антиоксиданаса из серума да делују на продукт реакције 2,2'-азино-ди-3-етилбенз-тиазолин сулфоната, специфичног хромогена, са метмиоглобином и водоник-пероксидом (126). Настали продукт је плаво-зелене боје, која се може мерити колориметријски на таласној дужини од 600 nm, и чији интензитет бива редукован дејством антиоксиданаса, пропорционално њиховој концентрацији у узорку. Метода подразумева примену Troloxa (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилне киселине), аналога витамина Е, као стандарда. Добијене вредности тумачене су у односу на референтни интервал за TAS: 1.3-2.3 mmol/l.

### 3.7. Концентрација стандардних биохемијских параметара

Концентрација стандардних биохемијских параметара (протеина, албумина, холестерола, триглицерида и мокраћне киселине) у серумима пацијената са DTC, као и у серумима здравих испитаника, одређивана је применом комерцијалних ензимских

реагенаса (Makler d.o.o, Belgrade, Serbia) на Olympus AU 400 анализатору. Референтне вредности за наведене параметре су: протеини 64-83 g/L, албумини 35-52 g/L, холестерол 3.10-5.20 mmol/L, триглицериди 0.10-1.70 mmol/L и мокраћна киселина 154- 428  $\mu$ mol/L.

### 3.8. Одређивање фреквенце микронуклеуса

Учесталост микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви анализирана је применом „Cytokinesis-block” микронуклеусног теста (CBMN) описаног од стране Fenecha и Morley 1985. године (60).

Пуна хепаринизирана крв (0.5 ml) додавана је у 5 ml комплетне подлоге за култивацију лимфоцита РВМах Karyotyping (Invitrogen, California, USA). Сваки узорак крви засејаван је у дупликату и инкубиран 72h на 37°C. Након 44h од почетка култивације културама је додаван цитохалазин В (Sigma, St Louis, MO, USA) у финалној концентрацији од 4 $\mu$ g/ml. Инкубација ћелијских култура је потом настављана још додатних 28h. По завршетку инкубације, узорци су центрифугирани 12 минута на 2000 обртаја/мин, након чега су ћелијске суспензије третиране хладним (4°C) хипотоничним, 0.56% раствором КСl два пута, и фиксирани три пута свежим фиксативом (сирћетна киселина:метанол = 1:3). Потом су узорци ресуспендовани у 0.5 ml фиксатива и разливани на хладне плочице. На осушене плочице додаван је 2% раствор Giemse (Alfapanon, Нови Сад, Србија) и испиран после 12 минута. Учесталост микронуклеуса одређивана је анализом 1000 бинуклеарних ћелија (BN) сходно Fenech-овим критеријумима (127).

„Cytokinesis-block” пролиферациони индекс (CBPI) одређен је према формули  $CBPI = (M1 + [2 \times M2] + [3 \times M3] + [4 \times M4]) / N$ , у којој „M1 - M4“ представљају број ћелија са 1-4 нуклеуса, док је „N“ укупан број вијабилних ћелија (57).

### **3.9. Изолација мононуклеарних ћелија периферне крви**

Мононуклеарни леукоцити добијени су из венске крви по методи Vouum-a (128). Узорци хепаринизирани периферне крви центрифугирани су 10 минута брзином од 400g, на собној температури. Плазма и издвојени слој леукоцита су Пастеровом пипетом пренети на Lymphoprep (Lymphoprep 1.077, Nicomed Pharma AS, Oslo, Norway) и центрифугирани на 800g, 20 минута на собној температури. Мононуклеарни леукоцити (издвојени на граници плазме и Lymphoprepa) су пажљиво сакупљени Пастеровом пипетом, испрани три пута сланим фосфатним пуфером (BPS) и ресуспендовани у 500  $\mu\text{L}$  истог пуфера.

### **3.10. Анализа популација мононуклеарних ћелија периферне крви**

Заступљеност појединих субпопулација у суспензији издвојених мононуклеарних ћелија периферне крви вршена је методом имунофенотипизације, на основу експресије одговарајућих мембранских CD маркера. По 100  $\mu\text{l}$  финалног раствора мононуклеарних ћелија периферне крви ( $5 \times 10^6$ - $10 \times 10^6$  ћелија/ml раствора) инкубирано је са 10  $\mu\text{l}$  моноклонског антитела примарно обележеног флуоресцентном бојом (анти CD3 *ecd*, анти-CD19 *fitc*, анти-CD56 *pe*, или анти-CD45 *pc5*), и са одговарајућом изотопском контролом (IgG1), током 15 минута на собној температури. После инкубације узорци су испрани два пута фосфатним пуферским раствором (BPS), фиксирани 2% (w/v) формалдехидом 10 минута на собној температури и анализирани на проточном цитометру. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи.

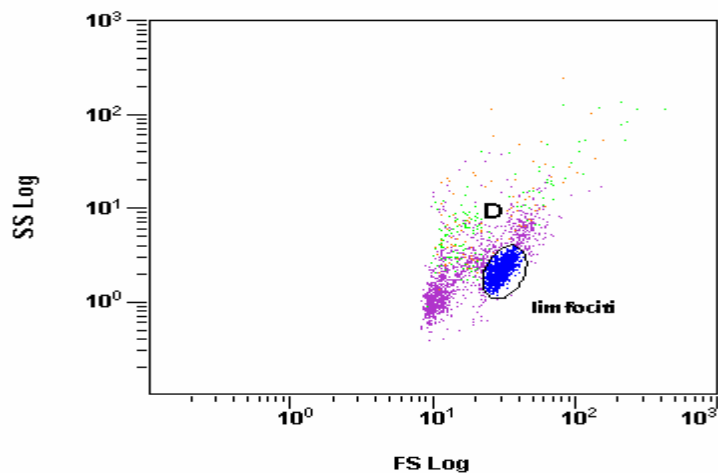
### **3.11. Одређивање процента апоптотичних и некротичних ћелија у узорцима мононуклеарних ћелија периферне крви**

Заступљеност апоптотичних и некротичних ћелија у суспензији свеже изолованих мононуклеарних ћелија периферне крви одређивана је методом двоструког бојења флуоресцентним бојама: Анексином V и 7-амино-актиномицином D (7-AAD), применом Annexin V-FITC/7-AAD комплекта (Beckman Coulter, France). Припремљени узорци су анализирани на проточном цитометру, а резултати су приказани у процентима: проценат ћелија које су детектоване у раној и касној фази апоптозе у односу на укупан број анализираних ћелија. У раној фази апоптозе интегритет ћелијске мембране је очуван, али мембрана губи карактеристичну фосфолипидну асиметрију, те фосфатидилсерин, који је негативно наелектрисан и налази се на унутрашњој страни плазма мембране, бива измештен на површину ћелије. То омогућава везивање Анексина V, који је калцијум и фосфолипид везујући протеин, за фосфатидилсерин на површини ћелијске мембране. У касној фази апоптозе, као и у некрози, ћелијска мембрана губи свој интегритет те ДНК бива изложена вијабилним бојама (129).

Annexin V-негативне и 7-AAD-негативне ћелије сматране су вијабилним неапоптотичним ћелијама, Annexin V-позитивне и 7-AAD-негативне ћелијама у раном стадијуму апоптозе, Annexin V-позитивне и 7-AAD-позитивне ћелијама у касном стадијуму апоптозе, док су Annexin V-негативне и 7-AAD-позитивне ћелије сматране некротичним ћелијама.

Мононуклеарне ћелије су након издвајања центрифугиране током 5 минута на 500 обртаја/мин. По одливању супернатанта, ћелије су ресуспендоване у везујућем пуферу до

концентрације од  $5 \times 10^6$ - $10 \times 10^6$  ћелија/ml раствора. Потом је у одговарајуће епрувете, запремине 5 ml, стављено по 100  $\mu$ L ћелијске суспензије и по 10  $\mu$ L Анексина V-FITC и 20  $\mu$ L 7-ADD вијабилне боје. Садржај епрувета је инкубиран током 15 мин на температури 25°C, у мраку, после чега је у сваку епрувету додавано по 400  $\mu$ L везујућег пуфера. Добијени узорци анализирани су на проточном цитометру FC500 Beckman Coulter, издвајањем популације лимфоцита на FS/SS дијаграму. Процент ћелија у раној и касној апоптози, као и проценат некротичних ћелија очитани су уз помоћ пратећег CXP Cytometer софтвера.



Слика 3.2. Дистрибуција ћелија добијена анализом узорака на проточном цитометру FC500 Beckman Coulter; популација лимфоцита на FS/SS дијаграму

### 3.12. Одређивање цитокинског профила

Концентрација цитокина (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-22, TNF- $\alpha$ ) одређивана је методом проточне цитометрије, применом BMS817FF e-Bioscience кита. Мешавина 25  $\mu$ L смеше зрнаца (енг. beads), 25  $\mu$ L стандарда/узорка и 50  $\mu$ L примарних антитела коњугованих са биотином инкубирана је 2

сата на собној температури (18-25°C) у мраку. Након инкубације у мешавину је додат 1mL пуфера, и добијена суспензија центрифугирана је 5мин на 2000 обртаја/мин. По уклањању супернатанта поступак испирања је поновљен, а добијени раствор третиран стрептавидин-фикоеритрином, те инкубиран на собној температури 1h. Уследило је двоструко испирање, и на крају ресуспендовање узорака серума и стандарда у 250  $\mu$ L пуфера, те анализа на проточном цитометру FC500 Beckman Coulter.

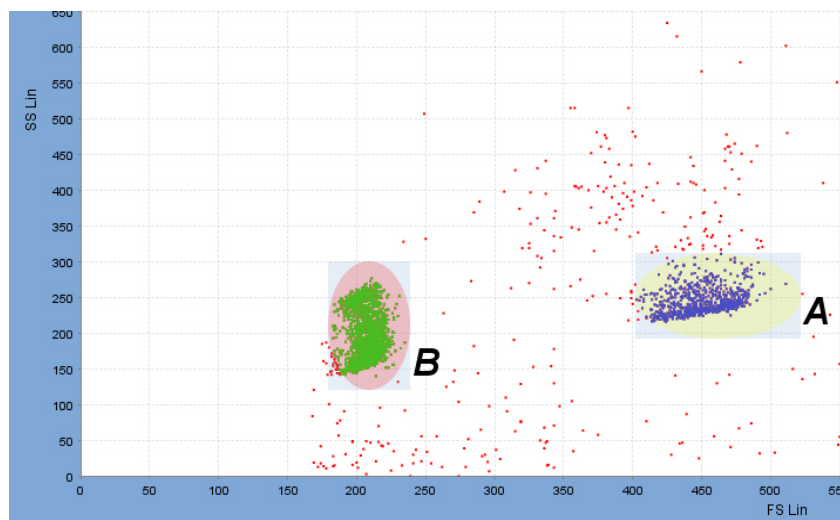
Концентрације одабраних цитокина одређиване су у серумима и у супернатантима фитохемаглутинином стимулираних ћелија пуне крви (*whole blood assay*) (130) пацијената са DTC и контролних испитаника. Узорци серума пацијената са DTC издвојени су пре, као и три и седам дана након апликације 131-I. Супернатанти митогеном стимулираних ћелија пуне крви добијени су пре и седам дана након апликације 131-I. Након инкубације пуне хепаринизираних крви у комплетаном медијуму за култивацију лимфоцита РВМах Karyotyping (Invitrogen, California, USA) у запреминском односу 1:10 током 72h, супернатанти су издвојени центрифугирањем на 2000 обртаја/мин током 15 минута, и до мерења чувани на -20°C.

Концентрације цитокина које су измерене у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви пацијената са DTC упоређиване су са концентрацијама цитокина које су измерене у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви контролних испитаника, као измерене вредности помножене фактором разблажења и као вредности које су добијене прерачунавањем на 1000 леукоцита (измерене вредности помножене фактором разблажења и подељене бројем леукоцита израженим у хиљадама/mL). На исти начин су упоређиване и концентрације цитокина које су измерене у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви DTC пацијената пре и после апликације 131-I.



Процена цитокинског профила вршена је на основу концентрација цитокина у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви (добитених прерачунавањем на 1000 леукоцита) и на основу односа концентрација контрарегулаторних цитокина (на 1000 леукоцита) (Th1/Th2) (130), и то: IL-12p70 и IL-13, IFN- $\gamma$  и IL-4, IFN- $\gamma$  и IL-5, IFN- $\gamma$  и IL-10, TNF- $\alpha$  и IL-4, TNF- $\alpha$  и IL-5, и TNF- $\alpha$  и IL-10.

Према упутству произвођача, мерни опсег BMS817FF e-Bioscience кита је: 0-20 000 pg/mL за следеће цитокине: IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-6, IL-13, IL-4, IL-5, IL-1 $\beta$ , и TNF- $\alpha$ ; 0-10 000 pg/mL за IL-17A; 0-2000 pg/mL за IL-9; и 0-80 000 pg/mL за IL-22.



Слика 3.3. Дистрибуција зрнаца популације А и В (beads cluster) добијена анализом узорака на проточном цитометру FC500 Beckman Coulter применом BMS817FF e-Bioscience кита

### 3.13. Статистичка обрада података

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS ver 13.0 for Windows. Разлике у посматраним параметрима између контролне групе испитаника и групе пацијената са DTC пре терапије <sup>131</sup>I тестиране су применом независног Т теста (енгл. Independent samples t-test) или применом теста суме рангова (Mann Whitney test)

зависно од дистрибуције, док су разлике између пацијената пре и након терапије 131-I анализиране применом упареног Т теста, односно једнофакторском анализом варијанси (ANOVA) или Friedman-овим тестом поновљених мерења, у случају да дистрибуција није била нормална. Међусобна повезаност посматраних варијабли и јачина везе испитивана је тестовима линеарне регресије и корелације (одређивањем Pearson/Spearman коефицијената). Вредности  $p$  мање од 0.05 сматране су статистички значајним, а мање од 0.01 високо статистички значајним.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Карактеристике пацијената са DTC

Карактеристике пацијената са DTC (старост, пол, хистолошке карактеристике тумора и стадијум болести, вредности TSH и Tg), као и апликована доза <sup>131</sup>I, дате су у табели 4.1. Сви пацијенти били су хипотиреоидни са просечном концентрацијом TSH од  $153.89 \pm 97.53$  mIU/L (минимална концентрација 31 mIU/L, максимална концентрација 364 mIU/L), док је средња концентрација серумског Tg износила  $9.48 \pm 11.70$  mg/L (минимална концентрација 0.10 mg/L, максимална 38 mg/L).

Табела 4.1. Карактеристике пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде који су лечени <sup>131</sup>I

Пацијент број	Старост (год)	Пол (Ж/М)	Стадијум (TNM)	Хистологија (P/F)*	Tg (mg/L)	TSH (mIU/L)	Доза (GBq)
1	43	М	T2N0M0	P	4.5	282	3.7
2	45	Ж	T1N1M0	P/F	0.5	65.7	3.7
3	42	Ж	T1N0M0	P	0.1	180	3.7
4	47	Ж	T1N0M0	P	1.0	148	3.7
5	40	М	T1N1M0	P	10.4	71	5.5
6	48	М	T2N0M0	P	0.1	168	3.7
7	60	Ж	T1N0M0	P	0.4	85	3.7
8	56	М	T3N1M1	P	2.3	306	5.5
9	61	Ж	T1N1M0	P/F	16.3	138	5.5
10	63	М	T3N1M1	F	36.2	175	5.5
11	76	Ж	T2N0M0	P	22	130	3.7
12	44	Ж	T1N0M0	P	21.6	359	3.7
13	63	Ж	T1N0M0	P/F	1.2	262	3.7
14	38	Ж	T1N1M0	P/F	2.1	62	5.5
15	66	М	T1N1M0	P	6.3	32.9	5.5
16	43	Ж	T1N0M0	P	16.4	170	5.5
17	20	Ж	T1N0M0	P/F	4.2	36.8	3.7
18	43	Ж	T1N0M0	P	2.1	128	3.7
19	64	Ж	T1N0M0	P	0.1	31	3.7
20	42	Ж	T2N0M1	P	15	142	5.5
21	71	Ж	T2N0M0	P	0.1	155	3.7
22	41	М	T2N1M0	P/F	38	76.5	5.5
23	40	М	T1N1M0	P	1.4	364	5.5
24	64	Ж	T2N1M0	P	25.3	125.6	5.5

\*P- папиларни карцином, P/F- фоликуларна подтип папиларног карцинома, F- фоликуларни карцином

Контролну групу здравих испитаника чинило је 19 (79.16%) жена и 5 (20.84%) мушкараца просечне старости  $46.37 \pm 12.79$  година (од 28 до 70 година). Просечна концентрација TSH била је  $1.50 \pm 0.67$  mIU/L (минимална концентрација 0.4 mIU/L, максимална концентрација 3.5 mIU/L), док је средња концентрација серумског Tg износила  $9.10 \pm 6.26$  mg/L (минимална концентрација 0.10 mg/L, максимална 19.5 mg/L).

У табели 4.2. приказане су просечне вредности укупног броја импулса детектованих гама камером при сцинтиграфији целог тела, као и просечан број импулса у регионима од интереса (регион тиреоидне ложе и абдомена), добијени уз помоћ пратећег софтверског пакета Syngo MI Applications 2009A ver:8.2.26.8\_VE32B16P30 IR26.5. Приказани подаци говоре о веома великој варијабилности броја импулса међу пацијентима који су примили исту дозу  $^{131}\text{I}$ . Тако је у групи пацијената са DTC којима је апликована доза од 3.7 GBq  $^{131}\text{I}$  укупан просечан број импулса био у распону од 762 500 до 7 681 643, док је у групи пацијената са DTC којима је апликована доза од 5.5 GBq  $^{131}\text{I}$ , минимална вредност укупног просечног броја импулса износила 1 513 000, а максимална 14 294 000. Следи да је однос између највећег и најмањег броја импулса 10.07 код пацијената којима је апликована доза од 3.7 GBq  $^{131}\text{I}$ , односно 9.47 код пацијената којима је апликована доза од 5.5 GBq  $^{131}\text{I}$ .

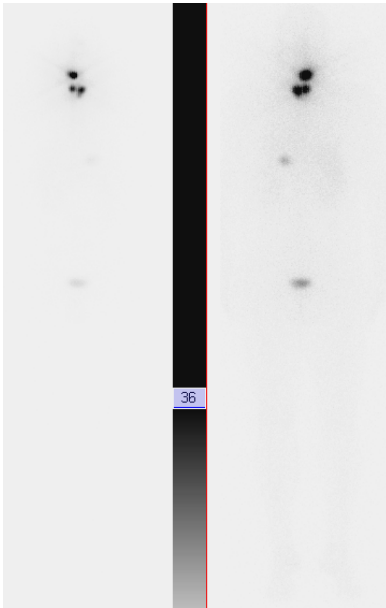
Најмања детектована просечна радиоактивност у пределу тиреоидне ложе износила је 11 500, а највећа 1 905 000 (по групама: 11 500–1 745 121 у групи пацијената са DTC којима је апликовано 3.7 GBq  $^{131}\text{I}$ , односно 26 935–1 905 000 у групи пацијената којима је апликовано 5.5 GBq  $^{131}\text{I}$ ).

Најмања детектована просечна радиоактивност у пределу абдомена била је 89 500, а највећа 3 588 500 (по групама: 89 500–3 025 719 у групи пацијената којима је апликовано 3.7 GBq  $^{131}\text{I}$ , односно 375 500–3 588 500 у групи пацијената којима је апликовано 5.5 GBq  $^{131}\text{I}$ ).

**Табела 4.2. Просечна радиоактивност у регионима од интереса (тиреоидне ложе и абдомена) и укупна просечна радиоактивност добијене са “whole body“ сцинтиграма 72h после апликације <sup>131</sup>I (3.7 или 5.5 GBq <sup>131</sup>-I)**

Пацијент број	Доза (GBq)	Тиреоидна ложа (импулси)	Абдомен (импулси)	Укупно (импулси)
1	3.7	227 500	89 500	762 500
2	3.7	14 083	208 490	920 842
3	3.7	31 000	581 500	1 091 500
4	3.7	142 000	256 500	1 178 000
5	5.5	99 500	621 500	1 513 000
6	3.7	11 500	523 500	1 600 500
7	3.7	27 479	495 927	1 753 918
8	5.5	36 500	375 500	2 080 000
9	5.5	72 841	601 480	2 380 382
10	5.5	26 995	659 500	2 514 000
11	3.7	726 500	1 178 500	3 221 000
12	3.7	72 841	1 429 332	3 240 314
13	3.7	791 214	1 150 183	4 228 839
14	5.5	1 445 000	781 500	4 460 000
15	5.5	1 905 000	708 500	4 832 000
16	5.5	633000	1 961 500	5 422 000
17	3.7	133 860	1 441 982	5 975 149
18	3.7	1 745 121	1 078 651	6 491 364
19	3.7	129 979	1 998 972	6 911 296
20	5.5	529 948	1 519 184	7 555 137
21	3.7	133 032	3 025 719	7 681 643
22	5.5	607 500	1 741 500	8 651 500
23	5.5	134 500	3 258 000	9 665 000
24	5.5	618 000	3 588 500	14 294 000

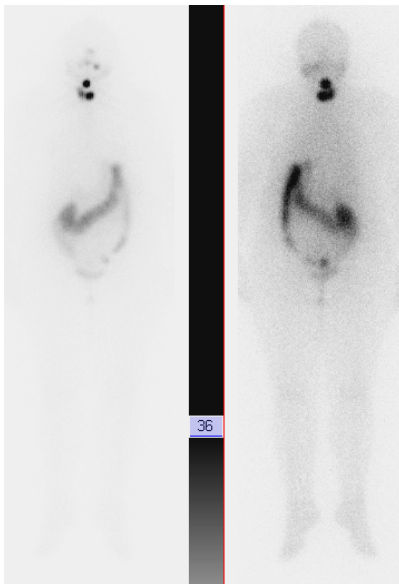
Пацијент бр. 1. (доза: 3.7 GBq)  
TSH=282 mIU/L, Tg=4.5 mg/L



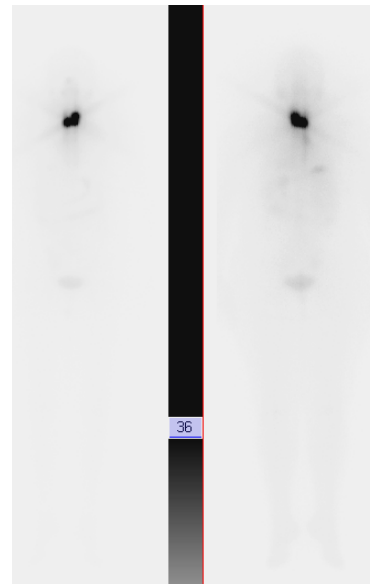
Пацијент бр. 12. (доза: 3.7 GBq)  
TSH=359 mIU/L, Tg=21.6 mg/L



Пацијент бр. 14. (доза: 5.5 GBq)  
TSH=62 mIU/L, Tg=2.1mg/L



Пацијент бр. 20 (доза: 5.5 GBq)  
TSH=142 mIU/L, Tg=15 mg/L

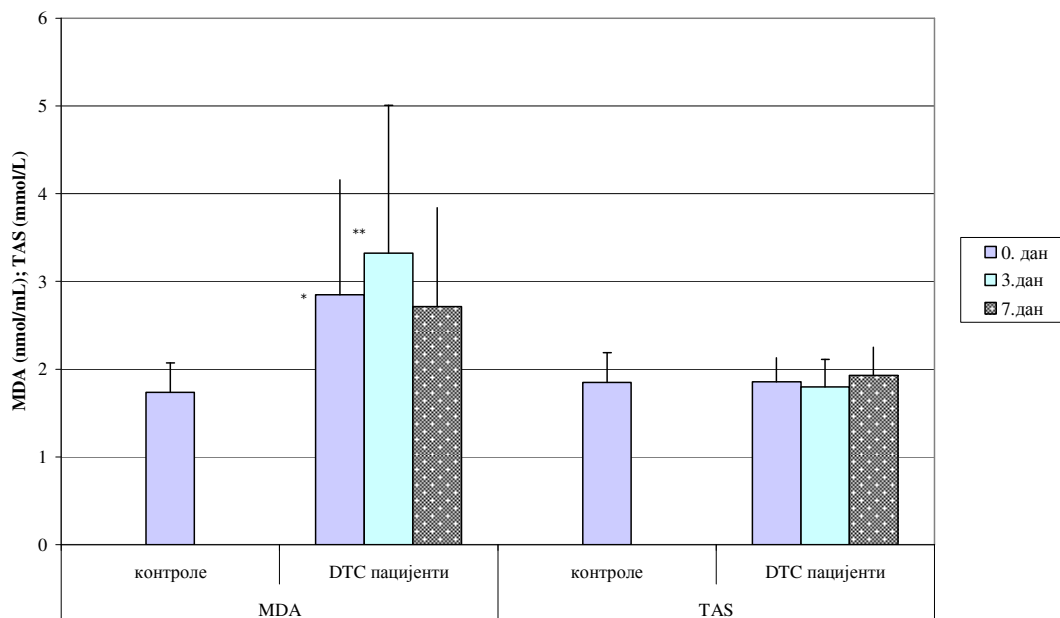


Слика 4.1. Репрезентативни “whole body” сцинтиграми регистровани код пацијената са DTC 72h после апликације  $^{131}\text{I}$ : акумулација  $^{131}\text{I}$  у AP и PA позицији код пацијента бр. 1 (стадијум: T2N0M0, TSH = 282 mIU/L, Tg = 4.5 mg/L) и бр. 12 (стадијум: T1N0M0, TSH = 359 mIU/L, Tg=21.6 mg/L) којима је апликовано 3.7 GBq  $^{131}\text{I}$ , и код пацијената под редним бројем 14 (стадијум: T1N1M0, TSH = 62 mIU/L, Tg = 2.1 mg/L) и 20 (стадијум: T2N0M1, TSH = 142 mIU/L, Tg = 15 mg/L), којима је апликовано 5.5 GBq  $^{131}\text{I}$ .

## 4.2. Оксидативни стрес код пацијената са DTC

### 4.2.1. Концентрација MDA, мокраћне киселине и тотални анти-оксидативни статус

Процена интензитета оксидативног стреса код пацијената са DTC вршена је на основу концентрације MDA, а антиоксидативна заштита процењивана је на основу концентрације мокраћне киселине и тоталног антиоксидативног статуса (TAS). Сви наведени параметри анализирани су пре терапије 131-I и три, односно седам, дана након терапије 131-I, и упоређивани са вредностима измереним у контролној групи здравих испитаника. Применом Т теста независних узорака показана је статистички значајно већа концентрација MDA у групи пацијената са DTC пре терапије 131-I у односу на контролну групу здравих испитаника ( $2.85 \pm 1.29$  nmol/ml vs.  $1.74 \pm 0.39$  nmol/mL; Independent samples t-test,  $p < 0.001$ ), док је тотални антиоксидативни статус био сличан у обе посматране групе ( $1.86 \pm 0.27$  mmol/L vs.  $1.85 \pm 0.31$  mmol/L; Mann Whitney test;  $p = 0.784$ ) (Слика 4.2). Осим тога, утврђено је постојање негативне корелације између концентрације MDA и TAS код пацијената са DTC пре апликације 131-I (bivariate correlation test, Spearman  $r = -0.478$ ,  $p = 0.018$ ).



**Слика 4.2. Концентрација MDA и TAS у групи пацијената са DTC пре (0.дан), 3 дана (3.дан) и 7 дана (7.дан) после терапије 131-I и у контролној групи здравих испитаника.**

\* статистички значајна разлика у концентрацији MDA у групи пацијената са DTC пре терапије у односу на контролну групу здравих испитаника

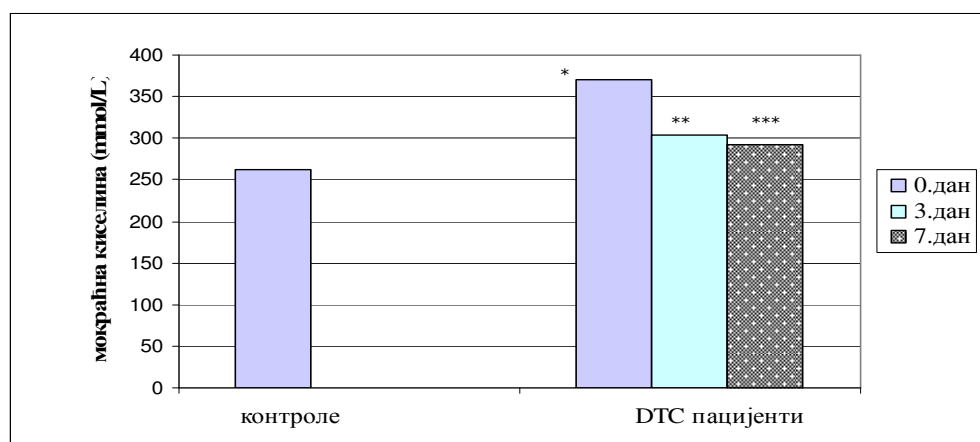
\*\* статистички значајна разлика у концентрацији MDA у групи пацијената са DTC три дана након терапије у односу на претерапијске вредности

Међугрупно тестирање разлика у концентрацији MDA код пацијената са DTC указало је на повећање оксидативног стреса три дана након терапије 131-I у односу на вредности пре терапије ( $3.32 \pm 1.60$  nmol/mL vs.  $2.85 \pm 1.29$  nmol/mL; Wilcoxon test,  $p=0.001$ ), са смањењем на  $2.71 \pm 1.11$  nmol/mL (Wilcoxon test,  $p=0.004$ ) недељу дана после терапије, тј. показана је статистички значајна промена концентрације MDA код пацијената са DTC након апликације 131-I ( $\chi^2(2, n = 24) = 13.067, p=0.001$ ), за разлику од TASA који се није битније мењао (Friedman's test,  $\chi^2(2, n=24)=3.433, p=0.180$ ).

Иако су седам дана од апликације 131-I детектоване нешто ниже вредности MDA него пре терапије, ове разлике нису биле статистички значајне ( $2.71 \pm 1.11$  nmol/mL vs  $2.85 \pm 1.29$  nmol/mL; Wilcoxon test,  $p=0.615$ ).



Концентрација мокраћне киселине у групи пацијената са DTC и у контролној групи здравих испитаника приказана је на Слици 4.3. Пре терапије пацијенти са DTC имали су статистички значајно већу концентрацију мокраћне киселине од контролних испитаника ( $369.95 \pm 112.89 \mu\text{mol/L}$  vs.  $261.66 \pm 84.03 \mu\text{mol/L}$ ; Mann Whitney test,  $p < 0.001$ ). Једнофакторска анализа варијансе поновљених мерења показала је прогресивни пад концентрације мокраћне киселине у крви након примене  $^{131}\text{I}$  (One way ANOVA,  $p = 0.011$ ), и то за око 17.73 % три дана након терапије ( $304.33 \pm 79.28 \mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0.024$ ) односно за 21.01% седам дана након терапије ( $292.21 \pm 85.71 \mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0.010$ ). У односу на период пре примене  $^{131}\text{I}$ , ове разлике су статистички значајне.



**Слика 4.3. Концентрација мокраћне киселине у групи пацијената са DTC пре (0.дан), 3 дана (3.дан) и 7 дана (7.дан) после терапије  $^{131}\text{I}$  и у контролној групи здравих испитаника**

\*статистички значајна разлика у концентрацији мокраћне киселине у групи пацијената са DTC пре терапије у односу на контролну групу здравих испитаника

\*\* статистички значајна разлика у концентрацији мокраћне киселине у групи пацијената са DTC три дана након терапије  $^{131}\text{I}$  у односу на концентрације пре терапије

\*\*\* статистички значајна разлика у концентрацији мокраћне киселине у групи пацијената са DTC седам дана након терапије  $^{131}\text{I}$  у односу на концентрације пре терапије

У табели 4.3. дате су вредности MDA, TAS и мокраћне киселине код DTC пацијената који су класификовани на основу хистолошког типа тумора.

Због великих разлика у броју испитаника, евентуално постојање међугрупних разлика у наведеним параметрима није тестирано.

**Табела 4.3. Малондиалдехид (MDA), тотални антиоксидативни статус (TAS) и мокраћна киселина код пацијената са папиларним (P), фоликуларним (F) и фоликуларном варијантом папиларног (P/F) карцинома пре (0.дан), 3 дана (3.дан) и 7 дана (7.дан) после терапије 131-I**

Анализирани параметар	Време анализе	Хистолошки тип DTC (P/F*)		
		P (n=17)	P/F (n=6)	F (n=1)
MDA (nmol/mL) X ± SD	0.дан	2.95 ± 1.32	2.65 ± 1.42	2.23
	3.дан	3.46 ± 1.69	2.95 ± 1.46	2.57
	7.дан	2.82 ± 1.15	2.30 ± 1.11	2.79
TAS (mmol/L) X ± SD	0.дан	1.85 ± 0.31	1.88 ± 0.14	2.04
	3.дан	1.79 ± 0.37	1.88 ± 0.23	1.53
	7.дан	1.88 ± 0.34	2.09 ± 0.11	2.04
Мокраћна киселина (μmol/L) X ± SD	0.дан	378.61 ± 124.42	338.0 ± 76.64	374
	3.дан	313.72 ± 85.06	285.80 ± 55.80	228
	7.дан	312.44 ± 82.92	225.20 ± 73.18	263

#### **4.2.2. Однос оксидативног стреса, апликоване дозе 131-I и импулса детектованих гама камером**

Тестирали смо утицај дозе апликованог 131-I на смањење концентрације мокраћне киселине. Просечно смањење концентрације мокраћне киселине било је нешто више код пацијената са DTC којима је апликована доза од 5.5 GBq 131-I у односу на пацијенте са DTC којима је апликована доза од 3.7 GBq, како три ( $56.77 \pm 47.90$  vs.  $54.18 \pm 39.10$  μmol/L), тако и седам дана ( $84.55 \pm 49.48$  vs.  $44.82 \pm 50.36$  μmol/L) после терапије, али без статистичке значајности ( $p > 0.05$ ). Такође, није показан утицај дозе на промену концентрације MDA и TAS три, односно седам дана након апликације 131-I ( $p > 0.05$ ).

С друге стране, показана је статистички значајна позитивна корелација између просечног броја импулса детектованих у области тиреоидне ложе и липидне пероксидације мерене концентрацијом MDA, седам дана после терапије 131-I у односу на претерапијске вредности (Bivariate correlation test, Spearman  $r = 0.458$ ,  $p = 0.024$ ).

### 4.3. Протеински и липидни профил пацијената са DTC

Код пацијената са DTC одређивана је концентрација протеина и липида пре апликације 131-I, као и 3 и 7 дана након апликације 131-I, и добијене вредности су упоређиване међусобно, а вредности пре терапије су упоређиване и са контролном групом здравих испитаника.

Код пацијената са DTC постоји статистички значајно већа концентрација протеина ( $87.16 \pm 6.04$  g/L vs.  $81.91 \pm 4.66$  g/L; Independent samples T test,  $p=0.002$ ), холестерола ( $8.84 \pm 2.09$  mmol/L vs.  $6.23 \pm 1.46$  mmol/L; Independent samples T test,  $p < 0.001$ ) и триглицерида ( $2.26 \pm 1.08$  mmol/L vs.  $1.32 \pm 0.63$  mmol/L, Mann Whitney test,  $p=0.001$ ) у односу на контролну групу здравих испитаника (Табела 4.4.).

Табела 4.4. Концентрација протеина и липида у групи пацијената са DTC пре терапије (0. дан), три дана (3. дан) и седам дана (7. дан) након 131-I терапије и у контролној групи здравих испитаника

параметар	Контролни испитаници	DTC пацијенти		
		0. дан	3. дан	7. дан
протеини (g/l)	$81.91 \pm 4.66$	$87.16 \pm 6.04^*$	$78.71 \pm 6.71^{**}$	$82.54 \pm 4.54^{***}$
албумини (g/l)	$55.21 \pm 5.31$	$57.42 \pm 5.23$	$52.54 \pm 5.23^{**}$	$53.83 \pm 3.63^{***}$
глобулини (g/l)	$26.71 \pm 4.88$	$29.71 \pm 5.48$	$26.16 \pm 6.37^{**}$	$28.79 \pm 4.23$
холестерол (mmol/l)	$6.23 \pm 1.46$	$8.84 \pm 2.09^*$	$8.12 \pm 2.13^{**}$	$8.41 \pm 2.13^{***}$
триглицериди (mmol/l)	$1.32 \pm 0.63$	$2.26 \pm 1.08^*$	$2.44 \pm 1.07^{**}$	$2.14 \pm 1.11$

\*статистички значајна разлика између групе пацијената са DTC пре терапије и контролне групе здравих испитаника

\*\* статистички значајна разлика у групи пацијената са DTC три дана након терапије у односу на претерапијске вредности

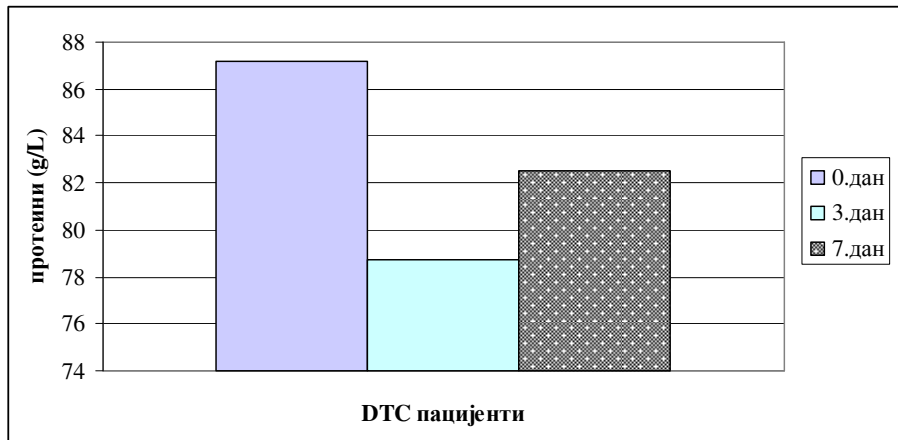
\*\*\* статистички значајна разлика у групи пацијената са DTC седам дана након терапије у односу на претерапијске вредности

Када су у питању промене биохемијских параметара након апликације 131-I, евидентно је да три дана након апликације 131-I настаје статистички значајно смањење

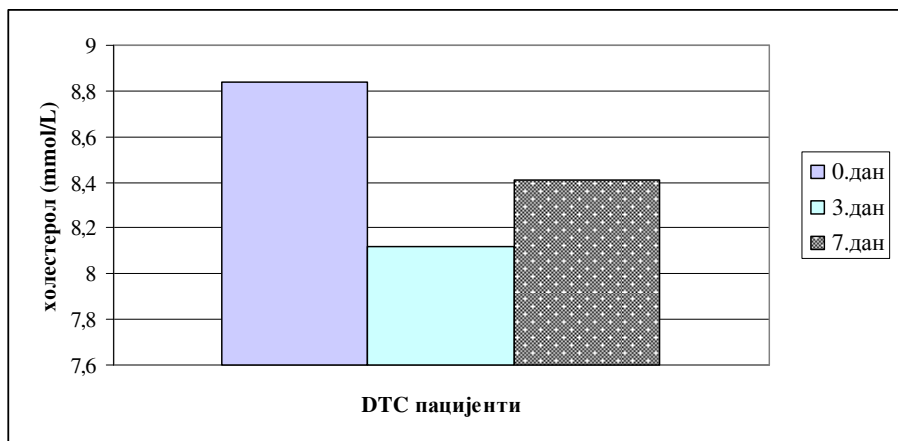
концентрације протеина ( $78.71 \pm 6.71$  g/L vs.  $87.16 \pm 6.04$  g/L;  $p < 0.001$ ), са непотпуним опоравком недељу дана након апликације  $^{131}\text{I}$ , тако да су на крају испитиваног периода протеини и даље статистички значајно нижи у односу на вредности измерене пре апликације  $^{131}\text{I}$  ( $82.54 \pm 4.54$  g/L vs.  $87.16 \pm 6.04$  g/L;  $p = 0.013$ ). Сходно томе, терапија радиоактивним  $^{131}\text{I}$  изазива значајне промене концентрације укупних протеина током посматраног периода (One way ANOVA,  $p < 0.001$ ).

Слично, показано је да након примене  $^{131}\text{I}$  настају значајне промене у концентрацији холестерола, статистички значајно смањење три дана после терапије у односу на концентрацију пре терапије ( $8.12 \pm 2.13$  mmol/L vs.  $8.84 \pm 2.09$  mmol/L;  $p = 0.001$ ), са повећањем концентрације 7 дана након терапије ( $8.41 \pm 2.13$  mmol/L vs.  $8.84 \pm 2.09$  mmol/L;  $p = 0.032$ ). Насупрот томе, нису регистроване значајне промене концентрације триглицерида након апликације  $^{131}\text{I}$  ( $\chi^2(2, n=24) = 3.583$ ,  $p = 0.167$ ). Накнадно међугрупно тестирање показало је статистички значајно повећање концентрација триглицерида три дана након терапије у односу на претерапијске вредности ( $2.44 \pm 1.07$  mmol/L vs.  $2.26 \pm 1.08$  mmol/L;  $p = 0.041$ ), што није био случај са концентрацијом триглицерида седам дана након терапије  $^{131}\text{I}$  ( $2.14 \pm 1.11$  mmol/L vs.  $2.26 \pm 1.08$  mmol/L;  $p = 0.225$ ) у односу на претерапијске вредности. Смањење концентрације протеина и холестерола праћено је повећањем концентрације триглицерида три дана од апликације радиоактивног  $^{131}\text{I}$ , са каснијим враћањем на вредности које су блиске претерапијским. Концентрације протеина и липида у групи пацијената са DTC приказане су на Слици 4.4.

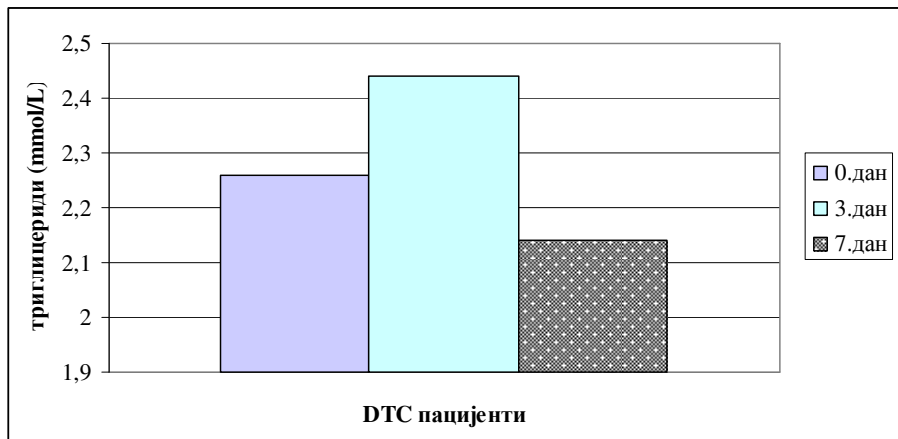
а)



б)

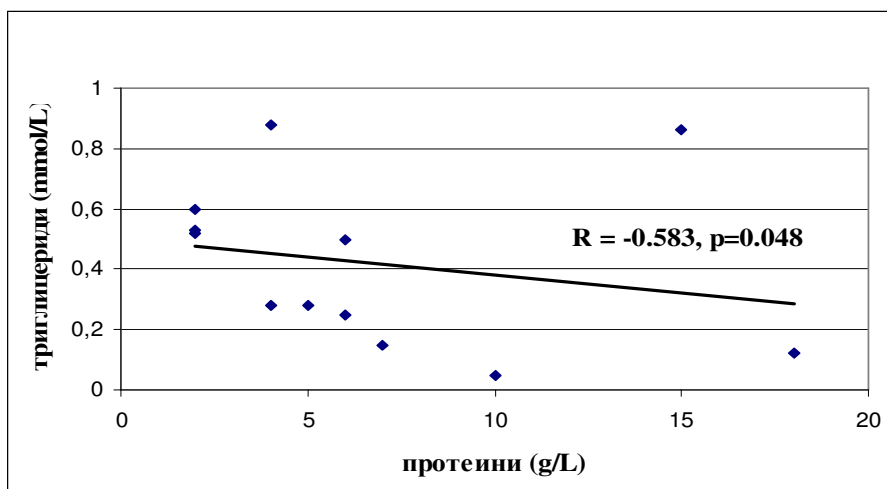


в)



Слика 4.4. Концентрације протеина (а), холестерола (б) и триглицерида (в) у групи пацијената са DTC пре (0.дан), 3 дана (3.дан) и 7 дана (7.дан) после терапије 131-И

С обзиром на то да са годинама долази до успорења метаболичких процеса, анализирали смо ефекте старења на концентрацију протеина, холестерола и триглицерида код пацијената са DTC. Најпре смо пацијенте са DTC поделили у две подгрупе: прву подгрупу чинили су пацијенти са највише 50 година, а другу пацијенти старији од 50 година. Није уочена статистички значајна разлика у концентрацији протеина ( $87.58 \pm 5.36$  g/L vs.  $86.75 \pm 6.86$  g/L; Independent T test,  $p=0.744$ ), холестерола ( $8.97 \pm 0.65$  mmol/L vs.  $8.72 \pm 1.99$  mmol/L; Independent T test,  $p=0.774$ ), и триглицерида ( $2.41 \pm 1.29$  mmol/L vs.  $2.12 \pm 0.85$  mmol/L; Mann Whitney test,  $p=0.671$ ) између две подгрупе пацијената пре терапије 131-I. Такође, није било значајних разлика у смањењу концентрације протеина и холестерола три и седам дана после терапије 131-I. Када је реч о односу протеина и липида, утврђена је статистички значајна индиректна корелација између концентрације протеина и концентрације триглицерида три дана после апликације 131-I код пацијената старијих од 50 година (Bivariate correlation test, Spearman  $r=-0.583$ ,  $p=0.048$ ) (Слика 4.5.), што није био случај са групом испитаника испод 50 година живота (Pearson  $r=-0.277$ ,  $p=0.384$ ).



Слика 4.5. Корелација протеина и триглицерида три дана после 131-I терапије код пацијената са DTC старијих од 50 година

## **4.4. Фреквенца микронуклеуса код пацијената са DTC**

### **4.4.1. Микронуклеусна фреквенца и “cytokinesis-block” пролифера-циони индекс (СВРІ)**

Применом СВМН есеја у групи пацијената са DTC (пре и 7 дана након апликације 131-I) и у контролној групи здравих испитаника одређена је фреквенца микронуклеуса и вредност СВРІ пролиферационог индекса. У бинуклеарним ћелијама пацијената са тиреоидним карциномом пре апликације 131-I било је од 7 до 33 микронуклеуса на 1000 анализираних ћелија, а 7 дана након апликације 131-I од 11 до 48 микронуклеуса на 1000 ћелија. Минимална вредност СВРІ пре терапије била је 1.20 а максимална 2.17, док је након терапије минимална вредност СВРІ била је 1.18 а максимална 1.99. У контролној групи здравих испитаника MN фреквенца варирала је од 0 до 10 микронуклеуса на 1000 бинуклеарних ћелија, док се пролиферациони индекс кретао у распону од 1.42 до 1.69 (Табела 4.5. и 4.6.).

Табела 4.5. Фреквенца микронуклеуса и СВРП код пацијената са DTC пре и 7 дана после апликације 131-И

Пацијент Бр.	Старост (год)	Пол (Ж/М)	Пушење (+/-)	Доза (GBq)	Пре терапије		После терапије	
					<i>MN/1000 BN ћелија</i>	СВРП	<i>MN/1000 BN ћелија</i>	СВРП
1	43	М	+	3.7	22	1.77	35	1.51
2	45	Ж	-	3.7	16	1.49	21	1.41
3	42	Ж	-	3.7	14	1.47	18	1.33
4	47	Ж	+	3.7	18	1.36	24	1.29
5	40	М	+	5.5	16	1.55	21	1.35
6	48	М	+	3.7	7	2.17	11	1.99
7	60	Ж	+	3.7	15	1.2	32	1.18
8	56	М	-	5.5	22	1.5	29	1.44
9	61	Ж	-	5.5	29	1.44	37	1.17
10	63	М	-	5.5	28	1.28	38	1.2
11	76	Ж	+	3.7	20	1.35	23	1.3
12	44	Ж	-	3.7	17	1.5	22	1.43
13	63	Ж	+	3.7	17	1.51	23	1.27
14	38	Ж	+	5.5	12	1.49	16	1.37
15	66	М	-	5.5	15	1.33	19	1.32
16	43	Ж	+	5.5	26	1.53	32	1.42
17	20	Ж	-	3.7	14	1.58	20	1.52
18	43	Ж	+	3.7	28	1.62	41	1.59
19	64	Ж	+	3.7	20	1.35	22	1.31
20	42	Ж	-	5.5	33	1.74	48	1.31
21	71	Ж	-	3.7	27	1.7	37	1.38
22	41	М	+	5.5	29	1.37	44	1.28
23	40	М	+	5.5	19	1.48	25	1.35
24	64	Ж	+	5.5	8	1.54	16	1.36



**Табела 4.6. Фреквенца микронуклеуса и СВРІ у лимфоцитима периферне крви здравих испитаника**

Контрола Бр.	Старост (год)	Пол (Ж/М)	Пушење (+/-)	<i>MN/1000 BN ћелија</i>	<i>СВРІ</i>
1	38	Ж	+	5	1.61
2	64	Ж	+	5	1.51
3	44	Ж	+	6	1.51
4	61	Ж	-	5	1.55
5	30	Ж	-	3	1.57
6	30	М	-	0	1.69
7	52	Ж	-	5	1.52
8	79	Ж	-	10	1.51
9	36	Ж	-	2	1.51
10	31	М	-	3	1.42
11	56	Ж	-	7	1.50
12	59	Ж	-	6	1.49
13	50	Ж	+	6	1.60
14	53	Ж	+	8	1.58
15	49	Ж	+	3	1.56
16	40	М	+	2	1.53
17	30	Ж	-	2	1.52
18	51	Ж	-	4	1.55
19	54	М	-	1	1.62
20	38	Ж	+	5	1.60
21	40	Ж	-	2	1.58
22	48	М	+	4	1.66
23	52	Ж	-	5	1.56
24	28	Ж	+	2	1.66

Поређењем фреквенце микронуклеуса у групи пацијената са DTC пре терапије радиоактивним <sup>131</sup>I и контролној групи здравих испитаника утврђено је да пацијенти са DTC пре терапије садрже већи број MN, што указује на већа хромозомска оштећења у односу на контролну групу испитаника.

Просечна MN фреквенца код пацијената са DTC пре терапије била је статистички значајно већа него код контролних испитаника (Independent samples T test,  $19.66 \pm 6.93$  vs.  $4.21 \pm 2.34$ ,  $p < 0.001$ ), а седам дана након терапије 131-I дошло је до значајног повећања у односу на претерапијске вредности (Paired samples test,  $27.33 \pm 9.82$  vs.  $19.66 \pm 6.93$ ,  $p < 0.001$ ).

У табели 4.7. приказана је дистрибуција микронуклеуса у BN ћелијама пре и 7 дана након терапије 131-I. У групи DTC пацијената након терапије било је укупно 455 BN ћелија са једним MN, у групи DTC пацијената пре терапије било је укупно 303 BN ћелије са једним MN, а у контролној групи здравих испитаника било је укупно 94 BN ћелије са једним MN. Број BN ћелија са 2 микронуклеуса био је знатно мањи у читавој студијској популацији (66 BN ћелија после терапије vs. 49 BN ћелија пре терапије и 6 BN ћелија код контролних испитаника), док су BN ћелије са 3 и 4 микронуклеуса нађене само код пацијената (не и здравих контрола) како пре, тако и након терапије 131-I.

**Табела 4.7. Дистрибуција микронуклеуса у групи пацијената са DTC пре и 7 дана после апликације 131-I и у контролној групи здравих испитаника**

Испитаници	Број BN ћелија			
	1 MN	2 MN	3 MN	4 MN
DTC пацијенти пре терапије 131-I	303	49	17	2
DTC пацијенти 7 дана после терапије 131-I	455	66	19	3
Контроле	94	6	-	-

Када је у питању индекс пролиферације ћелија, показано је да су претерапијске вредности СВРП у групи пацијената са DTC значајно ниже него у контролној групи здравих испитаника (Mann–Whitney test ( $1.51 \pm 0.19$  vs.  $1.56 \pm 0.06$ ;  $p = 0.027$ ), и да примена 131-I води статистички значајном смањењу пролиферационог капацитета ћелија седам дана од апликације ( $1.51 \pm 0.19$  vs.  $1.38 \pm 0.16$ ;  $p < 0.001$ ) (Табела 4.8.).

То значи да је ћелијски циклус успорен у лимфоцитима периферне крви пацијената са DTC, а терапија  $^{131}\text{I}$  га додатно успорава.

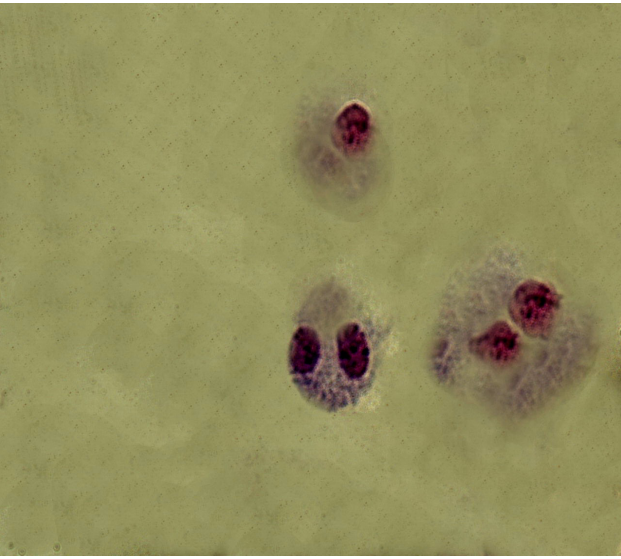
Статистичком анализом показано је да старост испитаника ( $p=0.707$ ), пол ( $p=0.831$ ), хистолошки тип тумора ( $p=0.461$ ), и присуство метастаза ( $p=0.190$ ) не утичу значајно на MN фреквенцу. Иако су код пушача нађене нешто више вредности претерапијске и радиоактивним  $^{131}\text{I}$  индуковане MN фреквенце у односу на непушаче, те разлике нису статистички значајне (binary logistic regression test,  $p_{\text{базална}}=0.286$ ;  $p_{\text{индукована}}=0.513$ ).

**Табела 4.8. Обједињени приказ вредности микронуклеусне фреквенце и пролиферационог индекса у групи пацијената са DTC (n=24) и у контролној групи здравих испитаника (n=24)**

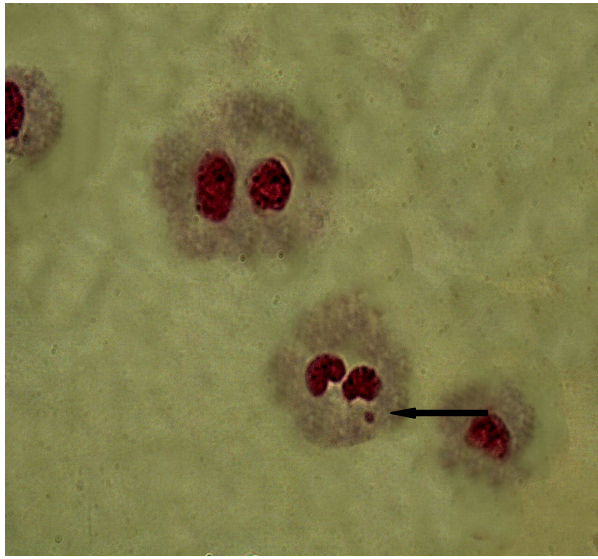
Анализа	Пацијенти					Контроле		
	n	<i>MN</i> фреквенца		<i>CBPI</i>		n	<i>MN</i> фреквенца	<i>CBPI</i>
		пре <i>131-I</i>	после <i>131-I</i>	пре <i>131-I</i>	после <i>131-I</i>		X ± S.D.	
Просечна старост Распон година	24	50.83±13.22 20-76				24	46.37±12.79 28-70	
укупно		19.66±6.93 <sup>a</sup>	27.33±9.82 <sup>b</sup>	1.51±0.19 <sup>b</sup>	1.38±0.16 <sup>г</sup>		4.21±2.34	1.56±0.06
Пол								
Мушкарци	8	19.25±7.63	27.37±11.45	1.54±0.28	1.43±0.24	5	2.00±1.58	1.58±0.11
Жене	16	19.87±6.80	27.31±9.31	1.49±0.14	1.35±0.11	19	4.78±2.17	1.55±0.04
Пушење								
Да	14	21.27±6.87	28.72±9.94	1.52±0.24	1.40±0.20	10	4.60±1.89	1.58±0.05
Не	10	18.30±6.94	26.15±9.95	1.50±0.13	1.35±0.10	14	3.93±2.64	1.54±0.06
Терапијска доза (GBq)						/		
3.7	13	18.07±5.57	25.31±8.46	1.54±0.24	1.42±0.20	/		
5.5	11	21.54±8.11	29.73±11.14	1.47±0.12	1.33±0.08	/		
Метастазе						/		
Да	11	21.63±8.05	29.90±10.25	1.49±0.11	1.34±0.08	/		
Не	13	18.00±5.61	25.15±8.57	1.53±0.25	1.42±0.21	/		
Стадијум						/		
T1N0M0/N1M0	15	18.40±6.03	25.26±9.21	1.49±0.12	1.38±0.09	/		
T2N0M0/N1M0/ N0M1	7	20.85±10.09	30.57±14.1	1.66±0.28	1.45±0.25	/		
T3N1M1	2	25	33.5	1.39	1.32	/		

а) p = 0.00 vs контроле, б) p = 0.00 vs. пре *131-I*, в) p = 0.027 vs. контроле, г) p = 0.00 vs. пре *131-I*

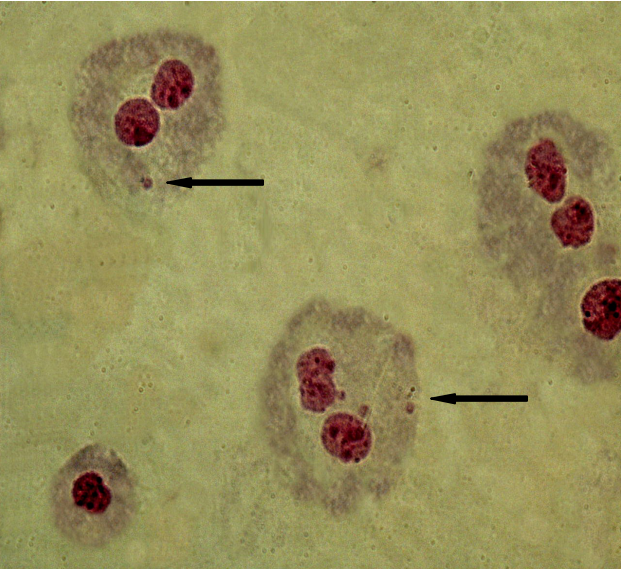
a)



б)



в)



г)



Слика 4.6. Репрезентативни снимци ћелија добијених применом СВМН есеја: а) моно- и биједарне ћелије без микронуклеуса, б) биједарна ћелија са једним микронуклеусом, в) биједарна ћелија са једним микронуклеусом и једарним пупољком, г) биједарна ћелија са два микронуклеуса

#### **4.4.2. Однос микронуклеуса, апликоване дозе $^{131}\text{I}$ и импулса детектованих гама камером**

Имајући у виду да је пацијентима са DTC апликовано 3.7 или 5.5 GBq радиоактивног  $^{131}\text{I}$ , испитиван је утицај дозе  $^{131}\text{I}$  на MN фреквенцу. Пацијенти са DTC којима је апликовано 5.5 GBq  $^{131}\text{I}$ , имали су у просеку нешто више вредности и претерапијске и радиоактивним  $^{131}\text{I}$  индуковане MN фреквенце у односу на пацијенте којима је апликовано 3.7 GBq  $^{131}\text{I}$  (пре терапије  $21.54 \pm 8.11$  vs.  $18.07 \pm 5.57$  и након терапије  $29.73 \pm 11.14$  vs.  $25.31 \pm 8.46$ ), али те разлике нису биле статистички значајне (Independent samples T test,  $p_{\text{пре}}=0.229$ ;  $p_{\text{после}}=0.282$ ).

Слично MN фреквенци, није било значајнијих разлика у вредностима СВРП између групе пацијената са DTC којима је апликовано 3.7 GBq и 5.5 GBq  $^{131}\text{I}$  (Wilcoxon test,  $p=0.649$ ), чиме је искључен статистички значајан утицај апликоване дозе на вредности пролиферационог индекса (Binary logistic regression,  $p=0.146$ ). Анализом односа броја детектованих импулса добијених са “whole body” сцинтиграма и фреквенце микронуклеуса индуковане  $^{131}\text{I}$  утврђено је постојање позитивне корелације између просечне радиоактивности детектоване у пределу тироидне ложе и броја микронуклеуса након терапије, и то у групи пацијената са DTC који су примили дозу од 3.7 GBq  $^{131}\text{I}$  (bivariate correlation test,  $p=0.026$ , Spearman  $r=0.612$ ). У истој групи пацијената утврђено је да просечна абдоминална радиоактивност позитивно корелира са концентрацијом TSH (bivariate correlation test,  $p=0.011$ , Spearman  $r=0.972$ ). За разлику од просечног броја детектованих импулса у регионима од интереса, просечна вредност укупног броја импулса детектованих 72h након апликације  $^{131}\text{I}$  није показала статистички значајан ефекат нити на  $^{131}\text{I}$  индуковану MN фреквенцу (bivariate correlation test,  $p=0.345$ ,

Spearman  $r=0.202$ ) нити на СВРІ вредности у лимфоцитима периферне крви (bivariate correlation test,  $p=0.979$ , Spearman  $r = - 0.06$ ).

## 4.5. Апоптоза и некроза лимфоцита периферне крви пацијената са DTC

### 4.5.1. Рана, касна апоптоза и некроза

Резултати који се односе на апоптозу лимфоцита периферне крви приказани су као проценат ћелија у раној фази апоптозе, касној фази апоптозе и укупан број апоптотичних ћелија. Пре апликације 131-I код пацијената са DTC значајно је већи проценат лимфоцита у стадијуму ране апоптозе у односу на контролну групу здравих испитаника ( $9.88 \pm 4.99\%$  vs.  $6.64 \pm 2.07\%$ ,  $p=0.003$ ), што није случај са процентом ћелија детектованих у касној фази апоптозе и некрозе. Иако је проценат лимфоцита у стадијуму касне апоптозе у групи пацијената са DTC пре апликације 131-I био већи него у контролној групи здравих испитаника ( $0.42 \pm 0.91\%$  vs.  $0.30 \pm 0.24\%$ ), као и проценат лимфоцита у некрози ( $0.11 \pm 0.32\%$  vs.  $0.025 \pm 0.04\%$ ), те разлике нису биле статистички значајне (табела 4.9.).

**Табела 4.9. Просечна процентуална заступљеност лимфоцита у апоптози/некрози у групи пацијената са DTC пре терапије 131-I и у контролној групи здравих испитаника**

	Пацијенти	Контроле	Статистичка значајност
рана апоптоза	$9.88 \pm 4.99$	$6.64 \pm 2.07$	<b><math>p = 0.003</math></b>
касна апоптоза	$0.42 \pm 0.91$	$0.30 \pm 0.24$	$p = 0.319$
укупна апоптоза	$10.30 \pm 5.38$	$6.94 \pm 2.15$	<b><math>p = 0.004</math></b>
некроза	$0.11 \pm 0.32$	$0.025 \pm 0.04$	$p = 0.584$

Након апликације радиоактивног  $^{131}\text{I}$  код пацијената са DTC регистровано је повећање процента лимфоцита који су били у стадијуму ране и касне апоптозе. Седам дана након апликације  $^{131}\text{I}$  у раној фази апоптозе било је  $13.53 \pm 6.57$  % лимфоцита, а у касној апоптози  $0.46 \pm 0.55$  % лимфоцита, док је у исто време у периферној крви било просечно  $0.09 \pm 0.24$  % некротичних лимфоцита. Очигледно је да  $^{131}\text{I}$  узрокује значајно повећање процента лимфоцита у раној апоптози (Wilcoxon test,  $p=0.008$ ), док је проценат лимфоцита у касној апоптози (Wilcoxon test,  $p=0.276$ ) и некрози 7 дана након апликације  $^{131}\text{I}$  (Wilcoxon test,  $p=0.801$ ) сличан претерапијским вредностима (табела 4.10.)

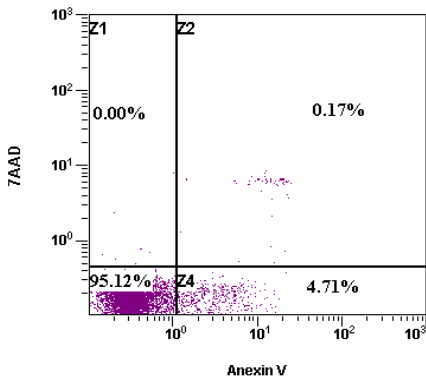
**Табела 4.10. Просечна процентуална заступљеност лимфоцита у апоптози/некрози у групи пацијената са DTC пре и 7 дана након терапије  $^{131}\text{I}$**

	Пацијенти пре $^{131}\text{I}$	Пацијенти после $^{131}\text{I}$	Статистичка значајност
рана апоптоза	$9.88 \pm 4.99$	$13.53 \pm 6.57$	<b><math>p = 0.008</math></b>
касна апоптоза	$0.42 \pm 0.91$	$0.46 \pm 0.55$	$p = 0.276$
укупна апоптоза	$10.30 \pm 5.38$	$13.99 \pm 6.61$	<b><math>p = 0.008</math></b>
некроза	$0.11 \pm 0.32$	$0.09 \pm 0.24$	$p = 0.801$

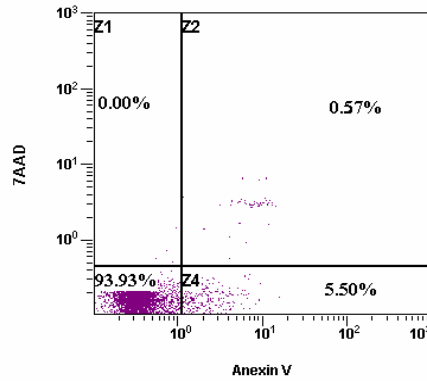
Анализом процентуалне заступљености лимфоцита у раној и касној апоптози у односу на стадијум тумора и присуство метастаза, није показана зависност процента апоптотичних ћелија од проширености тумора (One Way ANOVA test, пре  $^{131}\text{I}$  терапије  $p_{\text{рана}}=0.978$ ,  $p_{\text{касна}}=0.683$ , и после  $^{131}\text{I}$  терапије  $p_{\text{рана}}=0.743$ ,  $p_{\text{касна}}=0.459$ ) и присуства метастаза (Binar logistic regression, пре  $^{131}\text{I}$  терапије  $p_{\text{рана}}=0.648$ ,  $p_{\text{касна}}=0.337$ , и после  $^{131}\text{I}$  терапије  $p_{\text{рана}}=0.743$ ,  $p_{\text{касна}}=0.459$ ). На слици 4.7. приказана је процентуална заступљеност лимфоцита периферне крви у апоптози и некрози код два контролна испитаника и два пацијента са DTC, пре и 7 дана након  $^{131}\text{I}$  терапије.



а) Контрола 1.

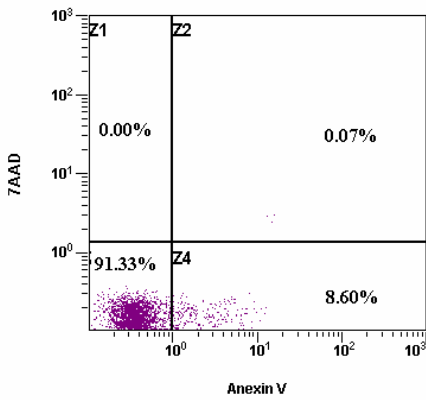


б) Контрола 2.

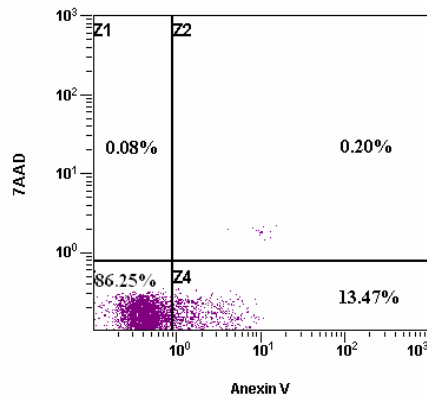


Пацијент 1.

в) Пре терапије

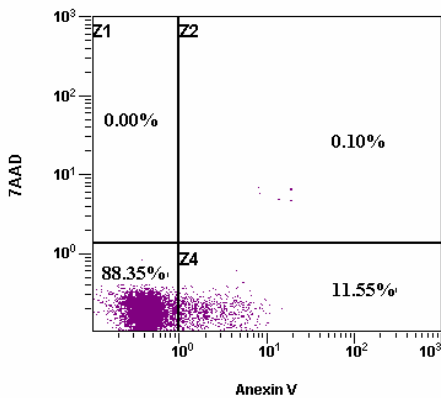


г) После терапије

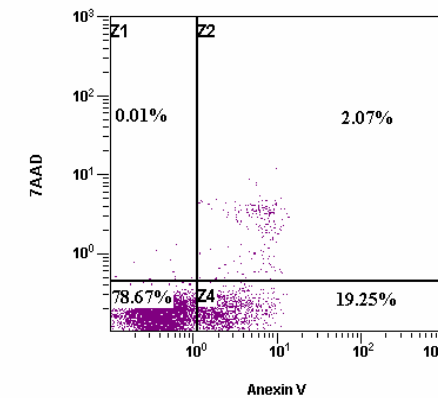


Пацијент 2.

д) Пре терапије



ђ) После терапије



Слика 4.7. Хистограми фреквенције са процентуалном заступљеношћу лимфоцита периферне крви у раној и касној фази апоптозе и некрози код два контролна испитаника (а,б) и два пацијента са DТС, пре (в,г) и 7 дана након 131-И терапије (д,ђ) добијени применом анексин-7-амино-актиномицин D есеја.

#### **4.5.2. Однос апоптозе и микронуклеусне фреквенце**

Анализом односа између микронуклеусне фреквенце и процента апоптотичних лимфоцита показали смо да постоји позитивна корелација између MN фреквенце и процента лимфоцита у раној апоптози пре терапије 131-I (bivariate correlation test, Spearman  $r=0.540$ ,  $p=0.021$ ) као и између MN фреквенце и укупног процента апоптотичних лимфоцита (рана+касна апоптоза) пре терапије 131-I (bivariate correlation test, Spearman  $r=0.549$ ,  $p=0.018$ ). Осим тога, утврдили смо статистички значајну корелацију између 131-I индуковане разлике у фреквенци микронуклеуса (број MN после терапије умањен за број MN пре терапије) и 131-I индуковане разлике у проценту ћелија у раној апоптози (рана апоптоза после терапије умањена за вредност ране апоптозе пре терапије) (bivariate correlation test, Spearman  $r=0.585$ ,  $p=0.014$ ), и разлике у укупном проценту апоптотичних ћелија (после минус пре терапије 131-I) (bivariate correlation test, Spearman  $r=0.579$ ,  $p=0.015$ ).

#### **4.6. Ћелије периферне крви пацијената са DTC**

У табели 4.11. приказан је просечан број ћелија периферне крви у групи пацијената са DTC пре 131-I терапије и у контролној групи здравих испитаника. Према нашим резултатима, не постоји статистички значајна разлика у броју еритроцита (Independent samples T test,  $p=0.859$ ), тромбоцита (Independent samples T test,  $p=0.532$ ), леукоцита (Independent samples T test,  $p=0.094$ ) и моноклеарних ћелија (Independent samples T test,  $p=0.882$ ) између пацијената са DTC пре терапије и контролне групе здравих испитаника.

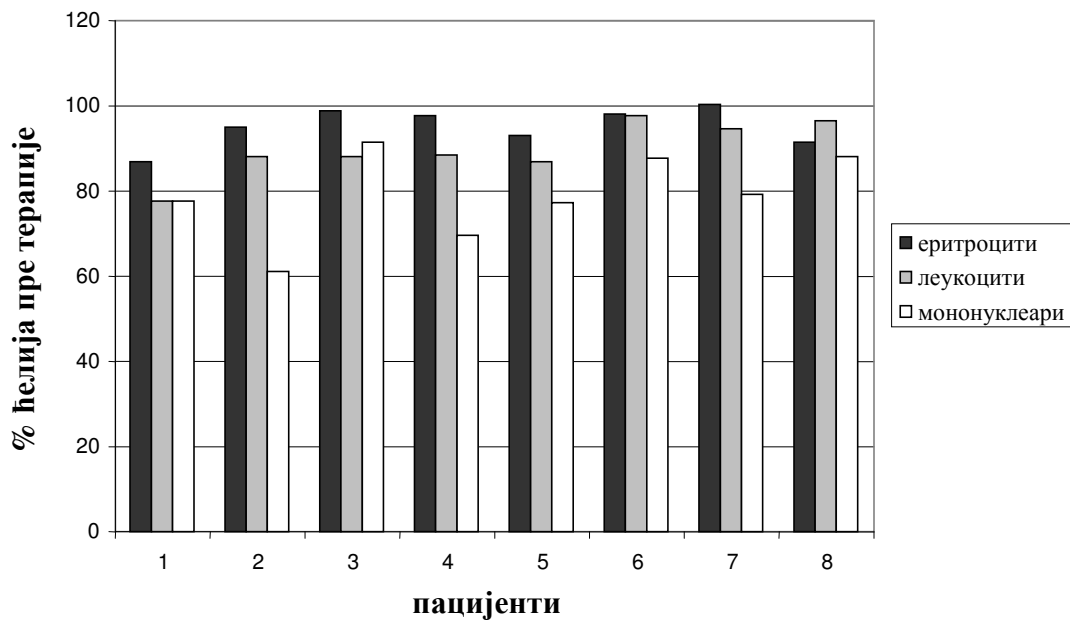
**Табела 4.11. Просечан број ћелија периферне крви у групи пацијената са DTC пре терапије 131I и у контролној групи здравих испитаника**

	Пацијенти	Контроле	Статистичка значајност
еритроцити ( $\times 10^{12}/\text{l}$ )	4.67 $\pm$ 0.50	4.62 $\pm$ 0.61	p = 0.859
тромбоцити ( $\times 10^9/\text{l}$ )	233.78 $\pm$ 59.02	250.25 $\pm$ 45.15	p = 0.532
леукоцити ( $\times 10^9/\text{l}$ )	7.03 $\pm$ 1.23	7.66 $\pm$ 1.21	p = 0.094
мононуклеари ( $\times 10^9/\text{l}$ )	2.23 $\pm$ 0.63	2.13 $\pm$ 0.43	p = 0.882

У односу на број еритроцита пре терапије, који је у просеку износио  $4.67 \pm 0.50 \times 10^{12}$  (интервал  $3.97-5.52 \times 10^{12}$ ), након 131-I терапије регистровано је статистички значајно смањење просечног броја еритроцита ( $4.37 \pm 0.36 \times 10^{12}$ , интервал  $3.80-4.90 \times 10^{12}$ , Paired Samples T test,  $p=0.012$ ). Просечан број тромбоцита пре терапије био је  $233.78 \pm 59.02 \times 10^9$  (интервал  $118-303 \times 10^9$ ), а седам дана после терапије  $213.67 \pm 56.26 \times 10^9$  (интервал  $82-275 \times 10^9$ ) (Paired Samples T test,  $p=0.042$ ). Слично еритроцитима и тромбоцитима, показана је статистички значајна разлика у просечном броју леукоцита пре и након 131-I терапије ( $7.03 \pm 1.23$  vs.  $6.33 \pm 1.29$ , Paired Samples T test,  $p < 0.001$ ), као и у просечном броју мононуклеарних ћелија седам дана после терапије 131-I у односу на претерапијске вредности ( $22.27 \pm 6.26$  vs.  $17.45 \pm 5.08$ , Wilcoxon test,  $p < 0.001$ ) (Табела 4.12.).

**Табела 4.12. Просечан број ћелија периферне крви у групи пацијената са DTC пре и 7 дана после терапије 131-I**

	Пацијенти пре 131-I	Пацијенти после 131-I	Статистичка значајност
еритроцити ( $\times 10^{12}/\text{л}$ )	$4.67 \pm 0.50$	$4.37 \pm 0.36$	<b>p = 0.012</b>
тромбоцити ( $\times 10^9/\text{л}$ )	$233.78 \pm 59.02$	$213 \pm 56.26$	<b>p = 0.042</b>
леукоцити ( $\times 10^9/\text{л}$ )	$7.03 \pm 1.23$	$6.33 \pm 1.29$	<b>p &lt; 0.001</b>
мононуклеари ( $\times 10^9/\text{л}$ )	$2.23 \pm 0.63$	$1.74 \pm 0.51$	<b>p &lt; 0.001</b>



**Слика 4.8. Ћелије периферне крви 7 дана после 131-I терапије (%) у односу на вредности пре терапије (100%) код осам репрезентативних пацијената са DTC**

Табела 4.13. даје приказ просечне експресије CD3, CD19 и CD56 маркера на лимфоцитима периферне крви у групи пацијената са DTC пре терапије и у контролној групи здравих испитаника. Статистичка анализа показала је да пацијенти са DTC пре апликације 131-I имају мању експресију CD3 маркера у односу на контролне испитанике

(72.49±7.26% vs. 77.21±6.80%) (Mann Whitney test, p=0.036). Насупрот томе, нису утврђене статистички значајне разлике у експресији CD19 (5.82±3.21% vs. 6.04±3.22%) (Independent samples T test, p=0.808) и CD56 мембранских маркера (16.79 ±6.74% vs. 13.57±4.67%, Mann Whitney test, p=0.054) између две посматране субпопулације.

**Табела 4.13. Експресија CD3, CD19 и CD56 маркера на лимфоцитима периферне крви у групи пацијената са DTC пре терапије 131-I и контролној групи здравих испитаника**

Анализа	Пацијенти (пре 131-I терапије)		Контроле	
	n	mean % ± SD	n	mean % ± SD
	24		24	
<b>CD3</b>		72.49 ± 7.26 <sup>a</sup>		77.21 ± 6.80 <sup>a</sup>
<b>CD19</b>		5.82 ± 3.21		6.04 ± 3.22
<b>CD56</b>		16.79 ± 6.74		13.57 ± 4.67

<sup>a</sup> статистички значајна разлика

Терапија 131-I изазива значајно смањење процентуалне заступљености CD19+ В лимфоцита код пацијената са DTC седам дана након апликације 131-I (3.93±2.60% после терапије 131-I према 5.82±3.21% пре терапије 131-I ) (Wilcoxon test, p=0.008), док је процентуална заступљеност CD3+ (72.49±7.26 % vs. 73.41±8.43%, Wilcoxon test, p=0.265) и CD56+ лимфоцита (16.79±6.74% vs. 17.26±7.12%, Wilcoxon test, p=0.710) остала непромењена.

Није показан утицај дозе 131-I на процентуалну заступљеност CD3+, CD19+, и CD56+ лимфоцита код пацијената са DTC након 131-I терапије (Binar logistic regression; p<sub>cd3</sub>=0.216, p<sub>cd19</sub>=0.973, p<sub>cd56</sub>=0.305), али је детектована разлика у броју CD3+ (p=0.024) и CD56+ (p=0.033) лимфоцита пре терапије код пацијената са и без метастаза (Табела 4.14.)

Табела 4.14. Сумарни приказ просечног броја CD3+, CD19+ и CD56+ лимфоцита у групи пацијената са DTC пре и 7 дана после 131-I терапије.

Анализа	Пацијенти		
	n	пре терапије mean ± SD	после терапије mean ± SD
<b>CD3</b>			
укупно	24	72.49 ± 7.26	73.41 ± 8.43
Метастазе			
одсутне	13	75.33 ± 5.28 <sup>a</sup>	74.48 ± 8.68
присутне	11	66.82 ± 7.65 <sup>a</sup>	71.26 ± 7.90
Терапијска доза (GBq)			
3.7	13	74.6 ± 5.45	72.54 ± 7.71
5.5	11	69.54 ± 8.68	74.62 ± 9.63
<b>CD19</b>			
укупно	24	5.82 ± 3.21 <sup>b</sup>	3.93 ± 2.60 <sup>b</sup>
Метастазе			
одсутне	13	5.76 ± 3.15	4.03 ± 2.81
присутне	11	5.92 ± 3.54	3.70 ± 2.27
Терапијска доза (GBq)			
3.7	13	6.37 ± 3.6	4.51 ± 2.89
5.5	11	5.03 ± 2.5	3.11 ± 1.97
<b>CD56</b>			
укупно	24	16.79 ± 6.74	17.26 ± 7.12
Метастазе			
одсутне	13	14.13 ± 4.36 <sup>b</sup>	16.13 ± 6.85
присутне	11	22.11 ± 7.74 <sup>b</sup>	19.5 ± 7.58
Терапијска доза (GBq)			
3.7	13	14.21 ± 4.68	16.56 ± 7.24
5.5	11	20.39 ± 7.71	18.24 ± 7.22

<sup>a</sup> статистички значајна разлика у CD3 експресији пре терапије у присуству метастаза (p = 0.024),

<sup>b</sup> статистички значајна разлика у CD19 експресији пре и после терапије (p = 0.008).

<sup>b</sup> статистички значајна разлика у CD56 експресији пре терапије у присуству метастаза (p = 0.033).

С обзиром на то да је након терапије радиоактивним 131-I показано статистички значајно повећање процента ћелија у раној и укупној апоптози, анализиран је утицај апоптозе на заступљеност појединих лимфоцитних субпопулација периферне крви. Анализом односа 131-I-индуковане апоптозе (укупна апоптоза после 131-I терапије умањена за вредност укупне апоптозе пре терапије) и 131-I-индукованог смањења CD19 експресије (CD19 експресија пре 131-I терапије умањена за вредност CD19 експресије после терапије), показано је да постоји позитивна корелација између посматраних

варијабли (Bivariate correlation test, Spearman  $r=0.563$ ,  $p=0.013$ ), што указује на то да се број CD19+ В лимфоцита смањује процесом апоптозе.

#### **4.7. Цитокински профил код пацијената са DTC**

У спроведеном истраживању испитивана је концентрација одабраних цитокина у серумима пацијената са DTC, као и концентрација цитокина у супернатантима фитохемаглутинином стимулираних ћелија пуне крви (*whole blood assay*) у групи пацијената са DTC и у контролној групи здравих испитаника.

Концентрације цитокина у серумима пацијената са DTC мерене су пре, као и три и седам дана након апликације радиоактивног  $^{131}\text{I}$ . Са изузетком IL-6 (код 6 пацијената), IL-2 (код једног пацијента) и IL-9 (код једног пацијента), све серумске вредности мерених цитокина биле су испод детекционог лимита. При том су вредности IL-6 биле детектабилне код два пацијента пре терапије, док је код преосталих пацијената IL-6 измерен у серуму три дана после терапије (код 2 пацијента), односно три и седам дана након терапије (код 2 пацијента) или само седам дана након терапије (код једног пацијента).

Концентрације IL-6 измерене у серумима пацијената са DTC приказане су у Табели 4.15. Немерљиве концентрације IL-6 код преосталих 18 пацијената нису приказане, као ни немерљиве концентрације IL-6 код свих контролних испитаника.

**Табела 4.15. Концентрација ИЛ-6 у серумима пацијената са DTC**

Концентрација ИЛ-6 (pg/ml)			
Пацијент	0 дан	3 дан	7 дан
Пацијент А	Н.Д.	6.13	6.13
Пацијент Б	6.59	Н.Д.	Н.Д.
Пацијент В	Н.Д.	7.78	Н.Д.
Пацијент Г	Н.Д.	7.01	Н.Д.
Пацијент Д	Н.Д.	Н.Д.	7.46
Пацијент Е	6.26	5.94	6.94

\*Н.Д. није детектована

Концентрације одабраних цитокина у супернатантима фитохемаглутинином стимулираних ћелија пуне крви у групи пацијената са DTC пре терапије радиоактивним <sup>131</sup>I и у контролној групи здравих испитаника приказане су у Табели 4.16.

Иако су за већину цитокина у супернатантима пацијената са DTC детектоване више вредности него у супернатантима контролних испитаника, статистички значајне разлике показане су за само два цитокина, и то за: ИЛ-13 (5463.5±3457 vs. 1453.5±1579.4 pg/ml, p=0.010) и ИЛ-5 (7721.6±6163.2 vs. 2808.8±2905.3 pg/ml, p=0.046).

**Табела 4.16. Концентрација цитокина у супернатантима митогеном стимулираних ћелија крви у групи пацијената са DTC пре <sup>131</sup>I терапије и у контролној групи здравих испитаника**

Цитокин	DTC пацијенти		Контроле		p
	Опсег (мин. – макс.) (pg/ml)	X±SD (pg/ml)	Опсег (мин. – макс.) (pg/ml)	X±SD (pg/ml)	
ИЛ-12p70	0.0 – 1928	605.2 ± 690.1	0.0 – 1242.3	247.6 ± 477.8	p = 0.161
IFN-γ	15191.6 – 135783.6	88666.2 ± 45320.8	1132.0 – 167439.3	74507.7 ± 62202.6	p = 0.611
ИЛ-17A	3324.5 – 61433	26350.9 ± 17905.3	2892.3 – 43198.6	15505.2 ± 12925.4	p = 0.186
ИЛ-2	1524.7 – 37333.2	14630.5 ± 12889.4	0.0 – 2343.91	6780.7 ± 9302.7	p = 0.083
ИЛ-10	486.8 – 22108.8	4850.8 ± 7183.3	0.0 – 5902.3	2468.0 ± 2204.4	p = 0.574
ИЛ-9	0.0 – 847.2	417.5 ± 272.2	0.0 – 491.8	164.3 ± 231.2	p = 0.083
ИЛ-22	0.0 – 2102.8	1352.6 ± 615.5	0.0 – 1812.8	580.1 ± 811.6	p = 0.105
ИЛ-6	3728.8 – 45931.8	17327.2 ± 15973	452.6 – 48358.7	16515.5 ± 17496.3	p = 0.959
ИЛ-13	1077.4 – 11412.3	5463.5 ± 3457	0.0 – 4510.7	1453.5 ± 1579.4	<b>p = 0.010</b>
ИЛ-4	614.2 – 3289.9	1655.8 ± 971.5	0.0 – 2856.7	914.2 ± 996.7	p = 0.154
ИЛ-5	1756.5 – 19537.8	7721.6 ± 6163.2	0.0 – 8372.9	2808.8 ± 2905.3	<b>p = 0.046</b>
ИЛ-1	1815.1 – 5443.9	3292.6 ± 1342	0.0 – 20586.1	6285.3 ± 6996.0	p = 0.574
TNF-α	0.0 – 33097.3	5156.2 ± 11305.4	0.0 – 2450.5	1015.9 ± 882.0	p = 0.442



С обзиром на то да лучење цитокина у фитохемаглутинином стимулисаној култури пуне крви зависи од броја ћелија, измерене концентрације цитокина су прерачунате на 1000 леукоцита, а добијене вредности приказане су у Табели 4.17. Статистички значајне разлике показане су за три цитокина. Поред IL-13 (1602.4±953.8 vs. 460±474.8 pg/ml, p=0.012) и IL-5 (2232.1±1608.5 vs. 869±842.4 pg/ml, p=0.046), статистички значајна разлика између пацијената са DTC и контролних испитаника показана је и за IL-9 (125.8±87.3 vs. 42.4±60.7 pg/ml, p=0.038).

**Табела 4.17. Концентрација цитокина у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви (на 1000 леукоцита) у групи пацијената са DTC пре 131-I терапије и у контролној групи здравих испитаника**

Цитокин	DTC пацијенти		Контроле		p
	Опсег (мин. – макс.) (pg/ml)	X±SD (pg/ml)	Опсег (мин. – макс.) (pg/ml)	X±SD (pg/ml)	
IL-12p70	0.0 – 662	189.6 ± 233.9	0.0 – 455.9	83.4 ± 167.7	p = 0.161
IFN-γ	4468 – 48493	27342.8 ± 15691.2	430.5 – 58035	22939.7 ± 19181.7	p = 0.623
IL-17A	976 – 14983	7742.6 ± 4561.4	1101– 14970	4890.9 ± 4364.9	p = 0.227
IL-2	447 – 10893	4321.8 ± 3767.8	0.00 – 8124	2140.6 ± 3013.6	p = 0.105
IL-10	144 – 5390	1318.5 ± 1744.0	0.0 – 1415	702.1 ± 512.9	p = 0.721
IL-9	0.0 – 293	125.8 ± 87.3	0.0 – 142	42.4 ± 60.7	<b>p = 0.038</b>
IL-22	0.0 – 724	416.6 ± 222.3	0.0 – 828	214 ± 312.3	p = 0.195
IL-6	1185 – 10753	5191.5 ± 4691.5	172 – 16759	5117.9 ± 5446.4	p = 0.959
IL-13	317 – 2730	1602.4 ± 953.8	0.0 – 1300	460 ± 474.8	<b>p = 0.012</b>
IL-4	181 – 1134	494.4 ± 311.5	0.0 – 823	286.2 ± 292.5	p = 0.190
IL-5	518 – 4763	2232.1 ± 1608.5	0.0 – 2412	869 ± 842.4	<b>p = 0.046</b>
IL-1	603 – 1861	992.4 ± 438.6	0.0 – 5993	1995.6 ± 2102.9	p = 0.505
TNF-α	0.0 – 8071	1329.9 ± 2731.6	0.0 – 849	336 ± 290.5	p = 0.505

Концентрације свих мерених цитокина код пацијената са DTC биле су мање у супернатантима фитохемаглутинином стимулираних ћелија пуне крви после терапије 131-I у односу на концентрације пре терапије. Међутим, статистички значајне разлике између концентрација цитокина у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви пре и после 131-I терапије показане су за: IL-17A (Wilcoxon test, p=0.012), IL-2

(Paired samples T test,  $p=0.042$ ), IL-10 (Wilcoxon test,  $p=0.036$ ), IL-6 (Wilcoxon test,  $p=0.012$ ), IL-13 (Wilcoxon test,  $p=0.017$ ) и IL-5 (Paired samples T test,  $p=0.012$ ) (Табела 4.18).

**Табела 4.18. Концентрација цитокина у супернатантима митогеном стимулираних хелија пуне крви у групи пацијената са DTC пре и 7 дана после терапије 131-I**

Цитокин	DTC пацијенти пре терапије		DTC пацијенти после терапије		p
	Опсег (мин. – макс.) (pg/ml)	X±SD (pg/ml)	Опсег (мин. – макс.) (pg/ml)	X±SD (pg/ml)	
IL-12p70	0.0 – 1928	605.2 ± 690.1	0.0 – 683.1	193.0 ± 290.3	p = 0.233
IFN- $\gamma$	15191.6 – 135783.6	88666.2 ± 45320.8	12718.8 – 130057.6	83000.7 ± 40639.2	p = 0.221
IL-17A	3324.5 – 61433	26350.9 ± 17905.3	3018.8 – 41572.7	14119.0 ± 13289.5	<b>p = 0.012</b>
IL-2	1524.7 – 37333.2	14630.5 ± 12889.4	1370.6 – 8482.2	4663.6 ± 2768.7	<b>p = 0.042</b>
IL-10	486.8 – 22108.8	4850.8 ± 7183.3	788.4 – 9032.3	2332.4 ± 2777.7	<b>p = 0.036</b>
IL-9	0.0 – 847.2	417.5 ± 272.2	0.0 – 789.2	260.1 ± 274.1	p = 0.106
IL-22	0.0 – 2102.8	1352.6 ± 615.5	0.0 – 1812.8	605.8 ± 841.1	p = 0.161
IL-6	3728.8 – 45931.8	17327.2 ± 15973	2526.4 – 29693.1	10023.8 ± 9368	<b>p = 0.012</b>
IL-13	1077.4 – 11412.3	5463.5 ± 3457	1084.9 – 5829.3	2131.5 ± 1593.6	<b>p = 0.017</b>
IL-4	614.2 – 3289.9	1655.8 ± 971.5	0.0 – 1351.8	587.0 ± 547.2	p = 0.059
IL-5	1756.5 – 19537.8	7721.6 ± 6163.2	0.0 – 9689.9	2900.5 ± 3509.4	<b>p = 0.012</b>
IL-1	1815.1 – 5443.9	3292.6 ± 1342	1523 – 6952.7	2915.6 ± 1942.7	p = 0.237
TNF- $\alpha$	0.0 – 33097.3	5156.2 ± 11305.4	640.3 – 2579.8	1048.2 ± 640.8	p = 0.093

С обзиром на то да смо раније показали се број леукоцита периферне крви смањује после терапије 131-I (Табела 4.12), капацитет леукоцита да продукују цитокине смо процењивали тако што смо концентрације цитокина у супернатантима митогеном стимулисане пуне крви поделили са бројем леукоцита за сваког пацијента и тестирали значајност разлика пре и после терапије 131-I. Када су измерене концентрације цитокина прерачунате на број леукоцита, добијене су вредности приказане у Табели 4.19.

**Табела 4.19. Концентрација цитокина у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви (на 1000 леукоцита) у групи пацијената са DTC пре и 7 дана после терапије 131-I**

Цитокин	DTC пацијенти пре терапије		DTC пацијенти после терапије		p
	Опсег (мин. – макс.) (pg/ml)	X±SD (pg/ml)	Опсег (мин. – макс.) (pg/ml)	X±SD (pg/ml)	
IL-12p70	0.0 – 662	189.6 ± 233.9	0.0 – 234	63.8 ± 92.0	p = 0.234
IFN-γ	4468 – 48493	27342.8 ± 15691.2	4386 – 54188	30145 ± 16658	p = 0.734
IL-17A	976 – 14983	7742.6 ± 4561.4	1041 – 25465	7261.9 ± 8258.9	p = 0.574
IL-2	447 – 10893	4321.8 ± 3767.8	472 – 2423	1419.0 ± 655.8	p = 0.067
IL-10	144 – 5390	1318.5 ± 1744.0	304 – 2580	770.4 ± 777.7	p = 0.574
IL-9	0.0 – 293	125.8 ± 87.3	0.0 – 226	89.1 ± 87.9	p = 0.417
IL-22	0.0 – 724	416.6 ± 222.3	0.0 – 629	211.2 ± 297.4	p = 0.234
IL-6	1185 – 10753	5191.5 ± 4691.5	973 – 8483	3472.8 ± 2823.1	p = 0.505
IL-13	317 – 2730	1602.4 ± 953.8	450 – 1666	709.4 ± 417.1	<b>p = 0.037</b>
IL-4	181 – 1134	494.4 ± 311.5	0.0 – 393	192.8 ± 169.7	<b>p = 0.031</b>
IL-5	518 – 4763	2232.1 ± 1608.5	0.00 – 2769	825.5 ± 1134.5	<b>p = 0.038</b>
IL-1	603 – 1861	992.4 ± 438.6	619 – 2104	1020.0 ± 638.6	p = 0.878
TNF-α	0.0 – 8071	1329.9 ± 2731.6	194 – 734	359.9 ± 168.8	p = 0.462

Иако су укупне концентрације свих мерених цитокина у супернатантима фитохемаглутинином стимулираних ћелија пуне крви после терапије 131-I биле мање у односу на концентрације пре терапије (Табела 4.18), са статистички значајним разликама за 6 мерених цитокина (IL-17A, IL-2, IL-10, IL-6, IL-13 и IL-5), када се анализирају концентрације цитокина прерачунате на број стимулираних леукоцита (Табела 4.19), евидентно је да је смањено лучење неких цитокина (IL-17A, IL-2, IL-10, IL-6) детектовано после терапије 131-I последица смањења броја леукоцита, а смањено лучење других цитокина (IL-13, IL-5 и IL-4) последица смањеног капацитета лучења од стране леукоцита периферне крви при неспецифичној стимулацији фитохемаглутинином *in vitro*.

У Табели 4.20 приказан је однос контрарегулаторних цитокина (Th1/Th2) у групи пацијената са DTC пре 131-I терапије и у контролној групи здравих испитаника. За процену баланса излучених Th1 и Th2 цитокина коришћене су концентрација цитокина у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви (на 1000 леукоцита).

Анализом односа IL-12p70/IL-13, IFN- $\gamma$ /IL-4, IFN- $\gamma$ /IL-5, IFN- $\gamma$ /IL-10, TNF- $\alpha$ /IL-4, TNF- $\alpha$ /IL-5 и TNF- $\alpha$ /IL-10 показано је да нема статистички значајне разлике између односа тестираних Th1 и Th2 цитокина у групи пацијената са DTC у односу контролну групу здравих испитаника.

**Табела 4.20. Однос контрарегулаторних цитокина у групи пацијената са DTC пре терапије и контролној групи здравих испитаника пре и 7 дана након 131-I терапије**

Th1/Th2	DTC пацијенти (пре терапије)	Контроле	Статистичка значајност
IL-12p70/IL-13	0.16 ± 0.24	0.10 ± 0.19	p = 0.234
IFN- $\gamma$ /IL-4	66.59 ± 60.41	46.19 ± 46.35	p = 0.645
IFN- $\gamma$ /IL-5	17.85 ± 13.96	24.03 ± 21.86	p = 0.512
IFN- $\gamma$ /IL-10	43.38 ± 31.27	29.42 ± 22.82	p = 0.325
TNF- $\alpha$ /IL-4	3.98 ± 8.66	0.67 ± 0.63	p = 0.279
TNF- $\alpha$ /IL-5	0.45 ± 0.52	0.34 ± 0.27	p = 0.959
TNF- $\alpha$ /IL-10	0.77 ± 0.54	0.48 ± 0.50	p = 0.284

У Табели 4.21 приказан је однос контрарегулаторних цитокина (Th1/Th2) у групи пацијената са DTC пре и после терапије 131-I. За процену баланса излучених Th1 и Th2 цитокина коришћене су концентрација цитокина у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви (на 1000 леукоцита). Анализом односа IL-12p70/IL-13, IFN- $\gamma$ /IL-4, IFN- $\gamma$ /IL-5, IFN- $\gamma$ /IL-10, TNF- $\alpha$ /IL-4, TNF- $\alpha$ /IL-5 и TNF- $\alpha$ /IL-10 показано је да нема статистички значајне разлике између односа тестираних Th1 и Th2 цитокина код пацијената са DTC пре и после терапије 131-I.

**Табела 4.21. Однос контрарегулаторних цитокина у групи пацијената са DTC пре и 7 дана након 131-I терапије**

Th1/Th2	DTC пацијенти		Статистичка значајност
	пре терапије	после терапије	
IL-12p70 / IL-13	0.16 ± 0.24	0.09 ± 0.17	p = 0.382
IFN-γ / IL-4	66.59 ± 60.41	47.88 ± 53.64	p = 0.574
IFN-γ / IL-5	17.85 ± 13.96	18.20 ± 21.31	p = 0.645
IFN-γ / IL-10	43.38 ± 31.27	59.46 ± 39.15	p = 0.379
TNF-α / IL-4	3.98 ± 8.66	0.84 ± 0.79	p = 0.442
TNF-α / IL-5	0.45 ± 0.52	0.56 ± 1.01	p = 0.574
TNF-α / IL-10	0.77 ± 0.54	0.64 ± 0.29	p = 0.564

## 5. ДИСКУСИЈА

### 5.1. Оксидативни стрес код пацијената са DTC

Оксидативни стрес проузрокован неравнотежом између стварања и уклањања слободних радикала може проузроковати повреду ћелије. Слободни радикали се у ћелијама стварају током физиолошких процеса (131,132), или настају дејством спољашњих фактора, као што је јонизујуће зрачење (133). Примена великих доза радиоактивног <sup>131</sup>I води настанку оксидативног стреса и оштећењу ћелија директно, нарушавањем интегритета ДНК, или индиректно, формирањем реактивних врста кисеоника (енгл. reactive oxygen species, ROS) (134). Настали метаболити кисеоника реагују са полинезасићеним масним киселинама ћелијске мембране изазивајући липидну пероксидацију и стварање цитотоксичних продуката, попут малондиалдехида (MDA) (135), чија продукција може бити редукована деловањем мокраћне киселине. Мокраћна киселина обезбеђује већи део антиоксидативног капацитета плазме и, за разлику од других антиоксиданаса, не подлеже даљој оксидацији (136).

У нашем раду испитивали смо интензитет оксидативног стреса и антиоксидативни статус код пацијената са DTC три и седам дана после терапије великим дозама <sup>131</sup>I (3.7 и 5.5 GBq). Процена интензитета оксидативног стреса вршена је на основу мерења концентрације MDA, док је антиоксидативна заштита процењивана на основу серумске концентрације мокраћне киселине и вредности тоталног антиоксидативног статуса (TAS). Тиме је омогућено добијање потпунијег увида у оксидо-редукционо стање пацијената са DTC. Наиме, тотални антиоксидативни капацитет серума не представља прост збир активности различитих антиоксиданаса, већ је реч о динамичном еквилибријуму који се остварује садејством појединачних компоненти антиоксидативне заштите (29,30).

Досадашња истраживања показала су да је код особа са разним врстама карцинома (36,137), укључујући и диферентоване карциноме штитасте жлезде (138-140), интензитет оксидативног стреса повећан и пре зрачне терапије. У нашем раду показали смо да је концентрација MDA статистички значајно већа у групи пацијената са DTC пре апликације <sup>131</sup>I у односу на контролну групу здравих испитаника, што је у складу са резултатима раније спроведених студија (141,142). Концентрација мокраћне киселине такође је била статистички значајно већа код пацијената са DTC пре <sup>131</sup>I терапије у односу на контролне испитанике, док је тотални антиоксидативни статус био сличан у обема посматраним групама.

Интензитет оксидативног стреса код пацијената са DTC након терапије радиоактивним <sup>131</sup>I испитивали су бројни аутори (141,143,144). Њихови резултати су доста неуједначени, највероватније због анализе различитих, појединачних маркера оксидативног стреса и антиоксидативне заштите, или због разлике у времену које је протекло од апликације радиоактивног <sup>131</sup>I до мерења. У неким студијама је показано повећање оксидативног стреса код пацијената са DTC након апликације <sup>131</sup>I (144), док у другим студијама то није нађено (145).

Наши резултати потврђују налазе Konukoğlu и сарадника (144), који су показали да се концентрација MDA значајно повећава после терапије радиоактивним <sup>131</sup>I, с том разликом што је у њиховом раду концентрација MDA мерена 2 дана после апликације <sup>131</sup>I, а у нашем раду 3 и 7 дана после апликације <sup>131</sup>I. Други аутори су детектовали транзиторно повећање концентрације MDA пет дана након апликације <sup>131</sup>I (146), односно мало иницијално повећање MDA месец дана после апликације <sup>131</sup>I, са статистички значајним смањењем 6 месеци после терапије (147). Иако смо у нашем раду желели да испитамо ране ефекте терапије <sup>131</sup>I, а највећи интензитет оксидативног стреса може се очекивати у првим сатима и данима након апликације <sup>131</sup>I,

концентрацију MDA нисмо мерили пре него што је прошло 72h од апликације  $^{131}\text{I}$  из техничких разлога (велике радиоактивности у телу пацијената, због које су они били изоловани). Поред тога, ми смо недвосмислено показали да се концентрација мокраћне киселине прогресивно смањује три, односно седам дана од апликације  $^{131}\text{I}$ . Претпостављамо да је ово смањење концентрације мокраћне киселине последица радијацијом индуковане продукције ROS и ангажовања мокраћне киселине као важног сегмента антиоксидативне заштите организма (139). При том, нису уочене значајније промене тоталног антиоксидативног статуса, што указује на то да у условима снажне јонизације коју проузрокује унутрашњи извор јонизујућег зрачења, укупни антиоксидативни статус остаје релативно стабилан.

Како су сви пацијенти обухваћени нашом студијом били хипотиреоидни ( $\text{TSH} > 30\text{mIU/L}$ ), анализирали смо могући утицај хипотиреозе на интензитет липидне пероксидације. За разлику од Pereira и сарадника, који су показали да хипотиреоза смањује ниво липидне пероксидације код мишева (148), ми смо показали да је код пацијената са DTC присутна интензивнија продукција MDA, што је највероватније последица недовољне антиоксидативне заштите и измењеног метаболизма липида (149). У нашем раду нису нађене разлике у интензитету липидне пероксидације и испитиваним параметрима антиоксидативне заштите између пацијената којима је апликовано 3.7 и 5.5 GBq радиоактивног  $^{131}\text{I}$ , те претпостављамо да је преклапање у броју импулса регистрованих са сцинтиграма целог тела пацијената којима су апликоване две различите дозе  $^{131}\text{I}$  дало овакав резултат. Насупрот томе, показана је позитивна корелација између просечне тиреоидне радиоактивности и степена липидне пероксидације, што указује на то да је већа резидуална активност у области тиреоидне ложе праћена интензивнијом јонизацијом и оксидативним оштећењем липида.



## 5.2. Биохемијски параметри код пацијената са DTC

Бољу акумулацију радиоактивног  $^{131}\text{I}$  у тиреоидном ткиву и јодавидним метастазама омогућава висока концентрација TSH (16). У клиничкој пракси висок ниво TSH остварује се двојачко: егзогеном применом TSH (18), или стимулацијом ендogene секреције TSH, са развојем пролазне хипотиреозе (19).

С обзиром на то да тиреоидни хормони утичу на синтезу, оксидацију и мобилизацију липида (150), као и синтезу и разградњу протеина, хипотиреоза код пацијената са DTC може бити праћена бројним метаболичким променама (151). Метаболички ефекти краткотрајне хипотиреозе, са посебним освртом на метаболизам липида, приказани су у неколико раније објављених студија (152-155), међутим промене у концентрацији протеина и њихов однос према липидима у серуму болесника са DTC пре и после терапије  $^{131}\text{I}$  до сада нису испитиване. Стога је један од циљева спроведеног истраживања био да се испита концентрација протеина и липида код пацијената са DTC пре, као и три и седам дана након  $^{131}\text{I}$  терапије.

У време апликације радиоактивног  $^{131}\text{I}$ , сви пацијенти обухваћени нашим истраживањем били су хипотиреоидни са значајно већим концентрацијама холестерола и триглицерида у односу на контролну групу здравих испитаника. Добијени резултати сагласни су са резултатима раније публикованих студија у којима је испитивана повезаност тиреоидног статуса и концентрације липида (156,157). Попут Regalbuto и сарадника (158), и ми смо показали да пацијенти са DTC имају повећану концентрацију холестерола пре апликације  $^{131}\text{I}$ , што не изненађује ако се има у виду утицај хормона штитасте жлезде на метаболизам липида.

Сматра се да је у хипотиреози основни механизам повећања концентрације холестерола смањење броја LDL рецептора на површини ћелија (159), док се смањена активност липопротеинске липазе може повезати са повећањем концентрације триглицерида (160).

Три дана након апликације радиоактивног  $^{131}\text{I}$  код пацијената са DTC детектовано је смањење серумске концентрације укупних протеина и албумина, уз смањење концентрације холестерола. Иако механизам којим настаје смањење концентрације протеина код наших пацијената није испитиван, можемо претпоставити да смањење концентрације протеина три дана након апликације  $^{131}\text{I}$  настаје као последица оксидативног стреса, јер су извесни аутори показали да оксидација (161) и оксидативна оштећења протеина (162) могу бити одговорни за смањење концентрације протеина код пацијената оболелих од карцинома. Исти механизам би могао бити одговоран и за смањење концентрације холестерола три дана након апликације  $^{131}\text{I}$ , мада се не може искључити ни могућност да радиоактивним јодом индукован оксидативни стрес изазива промене у структури молекула липида чинећи их немерљивим. За разлику од холестерола, код наших пацијената дошло је до статистички значајног повећања концентрације триглицерида три дана након апликације  $^{131}\text{I}$ , што можда представља покушај да се компензује смањење концентрације протеина, у циљу очувања колоидно-осмотског притиска.

Добро је познато да процес старења изазива низ метаболичких промена, које су праћене повећањем концентрације серумских липида (163). Смањење функције штитасте жлезде такође може допринети променама у метаболизму липида (164,165). Имајући то на уму, ми смо наше пацијенте са DTC поделили у две групе: прву групу чинили су пацијенти млађи од 50 година ( $\leq 50$  година), а другу пацијенти старији од 50 година ( $>50$  година).

Статистичка обрада података није показала значајне разлике у концентрацији серумских протеина, холестерола и триглицерида између две групе пацијената пре терапије 131-I. Међутим, код пацијената старијих од 50 година утврђена је индиректна веза између смањења концентрације протеина и повећања концентрације триглицерида три дана после терапије. Овај резултат подржава нашу претпоставку да повећање концентрације триглицерида настаје у одговору на смањење концентрације серумских протеина, у циљу одржавања колоидно-осмотског притиска.

### **5.3. Фреквенца микронуклеуса код пацијената са DTC**

Микронуклеуси представљају маркере генотоксичног оштећења проузрокованог дејством јонизујућег зрачења (57), а тест којим се одређује фреквенца микронуклеуса (engl. cytokinesis-blocked micronucleus assay, CBMN assay) је стандардни тест за детекцију нестабилности генома у молекуларним и цитогенетским студијама (166).

Веза између фреквенце микронуклеуса и изложености дејству јонизујућег зрачења први пут је описана 1959. године од стране Evansa и сарадника (167). Међутим, иако је повећање броја микронуклеуса код пацијената са DTC добро документовано (168-170), однос између дозе апликованог 131-I, као и повезаност фреквенце микронуклеуса са другим индикаторима оштећења ћелије, недовољно су испитани. У оквиру наше студије анализирали смо утицај терапије радиоактивним 131-I на степен цитогенетских оштећења, MN фреквенцу и индекс пролиферације ћелија (CBPI), код пацијената са DTC. С обзиром на то да се 131-I специфично везује и задржава у резидуалном тиреоидном ткиву, а да део 131-I перзистира и у другим деловима тела, нарочито у гастроинтестиналном тракту данима након апликације, желели смо да испитамо да ли ретенција 131-I у одабраним регионима од интереса и организму као целини утиче на

MN фреквенцу. Иако је у лимфоцитима периферне крви пацијената са DTC лечених радиоактивним <sup>131</sup>I показан настанак хромозомских аберација (171-173), повећање MN фреквенце (168-170,174) и промена пролиферационог индекса (CBPI) (69,76,175) остало је неразјашњено зашто те промене нису зависне од дозе апликованог јода. Према нашем сазнању, ни у једној до сада објављеној студији није анализиран утицај <sup>131</sup>I који перзистира у телу пацијената са DTC на MN фреквенцу и CBPI. Сем тога, постоји несагласност до сада публикованих резултата (176,177), највероватније због разлика у дизајну спроведених студија и времену протеклом од апликације <sup>131</sup>I. Ballardin и сарадници (174) су утврдили да 7 до 15 дана од апликације радиоактивног <sup>131</sup>I код пацијената са DTC настаје повећање MN фреквенце, које се постепено смањује и враћа на претерапијске вредности 6 месеци после терапије, док су Livingston и сарадници (168) показали да се повећање MN фреквенце код пацијената са DTC одржава и до 8 месеци након терапије <sup>131</sup>I. Насупрот томе, Joseph (178) је проучавао дугорочне ефекте терапије радиоактивним <sup>131</sup>I, анализирајући MN фреквенцу до 3 године после апликације <sup>131</sup>I. Наша истраживање показало је да DTC пацијенти пре терапије радиоактивним <sup>131</sup>I имају већи степен генетских оштећења, тј. статистички значајно већу MN фреквенцу и статистички значајно мањи CBPI, у односу на контролну групу здравих испитаника. Овакав резултат у сагласности је са претходно публикованим подацима да је претерапијска MN фреквенца значајно већа код пацијената са тиреоидним карциномом (69) и код пацијената са другим малигним туморима (68,70) него код контролних, здравих испитаника. Претпоставља се да се већи проценат биједарних лимфоцита са микронуклеусима код пацијената оболелих од карцинома може повезати са геномском нестабилношћу и дефектима у хелијском циклусу (71).

Као и други аутори (174,179) и ми смо показали да примена  $^{131}\text{I}$  води статистички значајном повећању MN фреквенце. После апликације радиоактивног  $^{131}\text{I}$  повећава се проценат биједарних лимфоцита периферне крви са једним или више микронуклеуса. У исто време, смањује се пролиферациони капацитет лимфоцита периферне крви. Овакви резултати одговарају закључцима до којих су дошли Ramirez (76) и Jianlin (180) проучавајући особе са карциномом штитасте жлезде и другим врстама тумора.

Утицај ретенције  $^{131}\text{I}$  у телу пацијената са DTC на MN фреквенцу није испитиван ни у једној до сада публикованој студији. У нашој студији ретенција  $^{131}\text{I}$  процењивана је на основу броја импулса из „whole body“ сцинтиграма регистрованих три дана после апликације  $^{131}\text{I}$ . Акумулација  $^{131}\text{I}$  у пределу тиреоидне ложе наших пацијената са DTC указује на присуство значајне количине резидуалног јодавидног ткива, упркос претходно урађеној тоталној тиреоидектомији, при чему велике индивидуалне разлике у броју импулса детектованих у тиреоидном региону највероватније одражавају количину преосталог тиреоидног ткива и степен диференцијације туморских ћелија.

Код неких пацијената уочена је велика радиоактивност и у области гастроинтестиналног тракта, углавном код оних са већим концентрацијама TSH, те сматрамо да је задржавање  $^{131}\text{I}$  у региону абдомена последица споре и одложене елиминације интестиналног садржаја у клинички испољеној хипотиреози (181). Код пацијената са DTC којима је апликована иста доза  $^{131}\text{I}$  детектоване су велике разлике у укупном броју импулса на сцинтиграму целог тела. Великим индивидуалним варијацијама укупне количине радиоактивног јода који се задржава у телу пацијената лечених истом дозом  $^{131}\text{I}$ , уз знатно преклапање броја импулса који је регистрован на сцинтиграмима целог тела пацијената лечених са 3.7 GBq и 5.5 GBq  $^{131}\text{I}$ , може се објаснити одсуство утицаја апликоване дозе на MN фреквенцу показано у нашој, али и у студијама других аутора (176, 182).

Статистичком обрадом наших резултата показано је да у групи пацијената који су лечени дозом од 3.7 GBq  $^{131}\text{I}$ , постоји корелација MN фреквенце са ретенцијом  $^{131}\text{I}$  у тиреоидном ткиву, али не и корелација MN фреквенце са укупном ретенцијом  $^{131}\text{I}$  у телу пацијената. Очигледно је да укупна количина радиоактивног  $^{131}\text{I}$  који се задржава у телу пацијената има мањи утицај на фреквенцу микронуклеуса од количине радиоактивног  $^{131}\text{I}$  који је акумулиран у тиреоидној ложи. Овакав резултат могао би се објаснити већим интензитетом зрачења коме су изложени лимфоцити који пролазе кроз тиреоидно ткиво.

Како бројни егзогени и ендогени фактори могу допринети оштећењу генома и хромозомској нестабилности, проучавали смо утицај старости, пола, пушења и хистолошког типа тумора на вредност MN фреквенце пре и након терапије  $^{131}\text{I}$ . Ефекти старења и пола на MN фреквенцу у лимфоцитима периферне крви предмет су истраживања још од 1980-их година (183,184). Општи је став да се фреквенца MN у лимфоцитима периферне крви повећава са старењем, и то код особа оба пола, вероватно као последица кумулативног ефекта стечених мутација у генима одговорним за репарацију ДНК и хромозомских аберација изазваних излагањем генотоксинима. Повећање учесталости MN код жена може се објаснити и поседовањем две копије X хромозома, те већом вероватноћом да један од њих буде изгубљен.

Када је у питању ефекат пушења, већина популационих студија указала је на то да код пушача током живота настаје повећање MN фреквенце, али без статистички значајне разлике у односу на непушаче (185). Осим тога, пушење може индуковати оштећења лимфоцита које би могла бити одговорна за губитак способности деобе током култивисања у CBMN есеју, са изостанком формирања биједарних ћелија (186). Наше

истраживање је показало да старост, пол, пушење и хистолошки тип тумора не утичу на фреквенцу микронуклеуса пре, као ни после терапије радиоактивним <sup>131</sup>I.

#### **5.4. Апоптоза лимфоцита код пацијената са DTC**

Апоптотски облик ћелијске смрти је активан процес који игра важну улогу у регулисању и одржавању броја ћелија у физиолошким условима, али може имати важну улогу и у настанку поремећаја хомеостазе у патолошким стањима. У физиолошким условима, апоптоза је усклађена са пролиферацијом ћелија, и тако доприноси ткивној хомеостази, а патолошко стање може настати услед повећања или смањења броја апоптотичних ћелија (187). Током апоптозе ћелија пролази кроз низ морфолошких промена. Најраније промене огледају се у асиметрији интактне ћелијске мембране, са експресијом фосфатидилсерина на њеној спољашњој страни. Касније долази до иреверзибилне кондензације цитоплазме и органела, кондензације хроматина, фрагментације једра и деградације ДНК, са губитком интегритета ћелијске мембране (188).

У нашем раду испитиван је проценат лимфоцита периферне крви у раној фази апоптозе (коју карактерише експресија фосфатидилсерина на спољашњој страни ћелијске мембране уз очуван интегритет) и касној фази апоптозе (коју карактерише губитак интегритета ћелијске мембране) лимфоцита. Показано је да се апоптотични лимфоцити периферне крви код пацијената са DTC углавном налазе у стадијуму ране апоптозе, што доприноси повећању укупног броја апоптотичних лимфоцита, при чему је проценат ћелија у раној апоптози и укупан проценат апоптотичних ћелија значајно већи него у контролној групи здравих испитаника. Велика разлика у проценту лимфоцита у раној и касној фази апоптозе која је показана у нашем истраживању могла би да се објасни разликама у трајању наведених стадијума апоптозе.

Наиме, сматра се да програмирана ћелијска смрт може трајати од неколико сати до неколико дана зависно од типа ћелије (79,189) и присуства иницијатора апоптозе (190), док касна апоптоза траје око један сат (191). Наши резултати сагласни су претходно публикованим радовима (87,91,92), али у поређењу са спонтаном апоптозом која је детектована у лимфоцитима периферне крви код пацијената са другим врстама тумора (88-90), код пацијената са DTC добијене су више вредности *ex vivo* апоптозе лимфоцита периферне крви пре терапије.

Иако је ефекат радиотерапије на апоптозу лимфоцита код особа са различитим врстама тумора проучаван и раније (97,98), утицај радиоактивног <sup>131</sup>I на апоптозу лимфоцита периферне крви код пацијената са DTC до сада није испитиван. Оксидативни стрес, настао као последица излагања јонизујућем зрачењу, изазива оштећења ДНК. Одговор ћелија на та оштећења може бити заустављање ћелијског циклуса, са активацијом механизма за поправку ДНК и потпуним биолошким опоравком ћелије или ћелијска смрт (189). Према томе, број ћелија који је усмерен у правцу програмиране ћелијске смрти може зависити од количине насталих слободних радикала с једне, и антиоксидативних способности организма, с друге стране.

У нашем раду је недвосмислено показано да терапија радиоактивним <sup>131</sup>I изазива повећање процента апоптотичних лимфоцита периферне крви, које је проузроковано повећањем процента ћелија у раној фази апоптозе. Када је у питању међусобни однос апоптозе и микронуклеуса, показали смо да MN фреквенца позитивно корелира са раном апоптозом лимфоцита како пре, тако и 7 дана након апликације <sup>131</sup>I. Апоптоза и микронуклеуси се јављају након прве митозе и везани су за оштећења генетског материјала. До сада су бројни аутори покушали да разјасне однос између заступљености апоптотичних ћелија и фреквенце микронуклеуса (192,193). Тако је у неким студијама



показано да апоптоза позитивно корелира са MN фреквенцом (194), док је у другима показана негативна корелација (195,196). Објашњење међусобног односа апоптозе и микронуклеуса доста је комплексно и подразумева добро познавање механизма настанка ћелијског оштећења и одговора ћелије на то оштећење. У принципу, апоптоза, као активан процес праћен кондензацијом хроматина, може допринети формирању микронуклеуса, чиме се врши сегрегација неактивног генетског материјала (197,198), док постојеће микронуклеус-носеће ћелије могу представљати својеврсни сигнал за активацију програмиране ћелијске смрти (199). Meintieres и сарадници (200) су показали да инхибиција апоптозе код прекомерне експресије антиапоптотичног Bcl-2 протеина води опстанку ћелија са значајним оштећењем генетског материјала, које настављају ћелијски циклус и касније се јављају у форми MN-носећих ћелија. Насупрот томе, повећан апоптотски капацитет може елиминисати ћелије са микронуклеусима и смањити MN фреквенцу. Из свега наведеног следи да MN фреквенца, као маркер оштећења ДНК молекула, зависи од тога да ли оштећујући агенс делује као промотор или инхибитор апоптозе (201), при чему се не сме занемарити ни ефекат других чинилаца, укључених у регулацију процеса апоптозе.

У нашем раду показано је да примена 131-I код пацијената са DTC води повећању процента апоптотичних ћелија, што је у позитивној корелацији са MN фреквенцом. На основу добијених резултата могло би да се тумачи да и поред повећања процента апоптотичних ћелија међу лимфоцитима периферне крви, то повећање апоптозе није довољно да елиминише повећан број ћелија са хромозомским оштећењима, те се детектује повећање броја ћелија са микронуклеусима. Свакако да би анализа порекла MN омогућила боље разумевање односа апоптозе и MN фреквенце, али то није било предмет нашег истраживања.

## 5.5. Ћелије периферне крви код пацијената са DTC

Иако се терапија радиоактивним <sup>131</sup>I сматра релативно безбедним видом терапије, његова примена може имати бројне нежељене ефекте, укључујући и промене у костној сржи и периферној крви (202,203). Степен супресије костне сржи зависи од више фактора, као што су укупна апликована доза <sup>131</sup>I, поновљени третмани радиоактивним јодом, резерва костне сржи и степен њене захваћености малигним процесом (202). С обзиром на то да су бубрежни клиренси код пацијената у хипотиреози снижени, то би могло да допринесе дужем задржавању <sup>131</sup>I у организму и повећању укупне апсорбоване дозе.

Иако је у бројним студијама испитивана пролазна анемија и тромбоцитопенија које су показане након примене <sup>131</sup>I (204,205), јонизујуће зрачење највећи утицај испољава на леукоците периферне крви (206). Већина објављених резултата указала је на то да ефекат <sup>131</sup>I на лимфоците периферне крви зависи од типа ћелије и времена протеклог од апликације <sup>131</sup>I. Међутим, нагло смањење броја лимфоцита периферне крви после терапије <sup>131</sup>I још није у потпуности разјашњено. Пошто смо у периферној крви наших пацијената са DTC након терапије <sup>131</sup>I показали повећање процента апоптотичних лимфоцита (207), испитивали смо евентуални утицај апоптозе на заступљеност лимфоцитних субпопулација.

Примена радиоактивног <sup>131</sup>I код пацијената са DTC проузрокује промене у броју целуларних елемената крви које могу перзистирати месецима (204), што указује на супресивни ефекат <sup>131</sup>I на костну срж (203,206). У раније публикованим радовима показано је смањење броја свих ћелија периферне крви код пацијената са DTC који су лечени <sup>131</sup>I: смањење броја еритроцита и концентрације хемоглобина (203), тромбоцита (203,204) и леукоцита (202).

И у нашем истраживању показано је статистички значајно смањење свих крвних елемената недељу дана након примене <sup>131</sup>I. Узимајући у обзир животни век еритроцита (преко 100 дана), ово смањење се не би могло објаснити дејством јонизујућег зрачења на незреле прекурсоре у костној сржи. Исто тако, мало је вероватно да је узрок смањења броја еритроцита радиосензитивност зрелих еритроцита.

Поред смањења броја еритроцита, код наших пацијената са DTC показано је и смањење броја тромбоцита седам дана после апликације <sup>131</sup>I, што је у корелацији са раније објављеним подацима других аутора (203,204). Међутим, у поређењу са другим студијама код наших пацијената детектовано је мање изражено смањење броја тромбоцита, највероватније због разлике у времену протеклом од апликације <sup>131</sup>I. За разлику од студија сличног дизајна у којима је број тромбоцита анализиран неколико месеци после апликације <sup>131</sup>I, у нашем раду су испитивани рани ефекти јонизујућег зрачења, и то 7 дана од апликације <sup>131</sup>I. Molinago и сарадници (206) су показали да примена <sup>131</sup>I изазива смањење броја тромбоцита које траје најмање годину од аблације, док је Rosario (208) показао пролазно смањење броја тромбоцита у прва 3 месеца после терапије. Према њиховим резултатима, краткорочни ефекти радиактивног јода на костну срж зависе од дозе апликованог <sup>131</sup>I, док је за касне ефекте углавном одговорна индивидуална осетљивост пацијената са DTC. Пошто у нашој студији није испитиван животни век тромбоцита, не можемо рећи да ли је смањење броја тромбоцита проузроковано њиховим повећаним уклањањем из периферне крви или не. Ако се има у виду нормалан животни век тромбоцита од око 7 до 10 дана, могли бисмо претпоставити да је смањење броја тромбоцита показано 7 дана након терапије бар делимично проузроковано смањеним стварањем у костној сржи и/или повећаним уклањањем из периферне крви.

Најинтересантнији и до сада највише проучаван је ефекат  $^{131}\text{I}$  на број леукоцита и дистрибуцију лимфоцитних субпопулација у периферној крви пацијената са DTC. И у ранијим (202), као и у недавно публикованим студијама (206) показано је да примена  $^{131}\text{I}$  у терапији пацијената са DTC проузрокује смањење броја леукоцита које је детектовано у периферној крви испитаника. И у нашем раду показано је статистички веома значајно смањење броја леукоцита седам дана након апликације  $^{131}\text{I}$ , знатно израженије од смањења еритроцита или тромбоцита.

Lloyd и Dolphin (209) су претпоставили да нагло смањење броја лимфоцита периферне крви после озрачивања целог тела није последица унутрашње радиосензитивности и радијацијом индуковане смрти тих ћелија. Они сматрају да смањење броја ћелија представља одраз њихове појачане миграције из крвних судова у друга ткива. Међутим, резултати већине објављених студија (210,211) указују на то да постоје разлике у радиосензитивности лимфоцитних субпопулација.

Пре  $^{131}\text{I}$  терапије наши пацијенти са DTC имали су значајно већи проценат CD3+ T лимфоцита од контролне групе здравих испитаника, и приближно једнаку заступљеност CD19+ B лимфоцита и CD56+ NK ћелија као и контролни испитаници. Литературни подаци о уделу NK ћелија у укупном броју ћелија периферне крви код пацијената са DTC су контрадикторни. У једној студији је показано повећање процента NK ћелија код пацијената са DTC (212), док је у другој утврђена повећана осетљивост NK ћелија на апоптотичне сигнале и смањење броја NK ћелија након прекида супституционе терапије тироксином (213).

Иако су пацијенти који су укључени у нашу студију били изразито хипотиреоидни, нисмо открили статистички значајну разлику у проценту CD56+ NK ћелија између пацијената са DTC пре терапије и контролних испитаника. Међутим, у нашем раду је показано да пацијенти са метастазама имају значајно већи проценат CD56+ NK ћелија од

пацијената без нодалних или удаљених метастаза, што је у складу са чињеницом да НК ћелије имају важну улогу у одбрани организма од тумора, и да могу допринети регресији тумора и елиминацији туморских ћелија из крви (211,214). При том, ми нисмо анализирали активност НК ћелија нити проценат НК ћелија са регулаторним и цитолитичним фенотипом, док је Wulff (215) показао смањење процента регулаторних НК ћелија у периферној крви оболелих од карцинома главе и врата.

Када су у питању CD19+ В лимфоцити, у нашем раду смо показали да 7 дана након апликације 131-I код пацијената са DTC долази до значајног смањења броја В лимфоцита у периферној крви. Овај резултат је у складу са раније објављеним резултатима да су хумани В лимфоцити знатно осетљивији на зрачење од Т лимфоцита (210). Blomgren (216) је показао да се проценат В лимфоцита у укупној лимфоцитној популацији код особа изложених X зрачењу смањује за половину.

Имајући у виду повећање процента апоптотичних лимфоцита периферне крви код пацијената са DTC којима је апликован 131-I (207), анализирали смо и утицај програмиране ћелијске смрти на број CD19+ В лимфоцита. Наши резултати указују на то да апоптоза доприноси смањењу броја В лимфоцита у периферној крви пацијената са DTC који су лечени радиоактивним 131-I.

#### **5.4.Цитокински профил код пацијената са DTC**

Очекивани ефекат примене великих доза 131-I је јонизација материје праћена стварањем слободних радикала и настанком оксидативног стреса (133). Најновији радови указују на то да оксидативни стрес може подстаћи ослобађање IL-1 $\beta$  и IL-18 (217), односно TNF и IL-6 (218), као и да цитокини могу бити маркери радијационог оштећења ћелија/ткива (219).

У раније публикованим студијама показана је повећана серумска концентрација IL-4 и IL-6 код пацијената са колоректалним карциномом (220), IL-6, IL-8 и IL-10 код пацијената са карциномом дојке (221), IL-6 и IL-10 код пацијената са не-Хочкиновим лимфомом (222) и IL-4 код пацијената са карциномом плућа (223). Концентрације цитокина у серумима наших пацијената углавном су биле испод детекционог лимита, са изузетком IL-6, IL-2 и IL-9, и то код веома малог броја пацијената. Сличне податке добили су Kim и сарадници који су показали да су IL-9 и IL-12p70 недетектибилни код већине пацијената са хепатоцелуларним карциномом (224). Добијени резултати указују на то да код пацијената са карциномом не постоје промене у серумским концентрацијама цитокина, или да методе које су коришћене нису биле довољно сензитивне да детектују серумске концентрације цитокина. У нашем раду, концентрације одабраних цитокина мерили смо методом проточне цитометрије а не ELISA тестом, те се не може искључити могућност да би ELISA тест дао нешто другачије резултате, бар за IL-6, чије је повећање показано у неким студијама (220-222).

Код малог броја наших пацијената са DTC детектовано је рано повећање концентрације IL-6 три и/или седам дана након апликације 131-I, што би могло да буде последица отпуштања цитокина из зрачењем оштећеног резидуалног ткива или метастатских депозита (225,226). Наши резултати сагласни су са резултатима Zata (227), који је анализирао ефекат 131-I терапије код пацијената са DTC на серумску концентрацију IL-6, али је у његовој студији концентрација IL-6 мерена до неколико месеци након апликације радиоактивног 131-I, док је у овом раду концентрација IL-6 анализирана само 3. и 7. дана после апликације 131-I.

С обзиром на то да 131-I проузрокује пострадијационо запаљење, које би могло да буде праћено продукцијом протеина акутне фазе запаљења, анализирали смо концентрацију C реактивног протеина (CRP) (резултати нису приказани). Повишена

вредност CRP пре апликације 131-I детектована је код 6 пацијената са DTC, тј. код 3 пацијента са DTC три дана после терапије, од којих је двоје имало повишен CRP и седам дана након терапије. Савремени литературни подаци указују на постојање неколико механизма којима би се могло објаснити повећање серумске концентрације CRP код особа са туморима. У току раста, тумор може индуковати запаљење околног ткива и продукцију CRP, али повишен ниво CRP може бити и последица одговора организма на туморске антигене (228,229). Неки аутори су утврдили да ћелије извесних тумора продукују CRP (230,231), или поседују могућност секреције IL-6 и IL-8 који потом индукују стварање CRP (232). Међутим, код већине пацијената са DTC обухваћених нашим радом није забележено повећање концентрације CRP ни пре, нити након терапије радиоактивним 131-I. Наши резултати сагласни су резултатима неких раније публикованих студија других аутора (228, 233).

Када је у питању концентрација цитокина у супернатантима фитохемаглутинином стимулираних ћелија пуне крви, показано је да ћелије пуне крви пацијената са DTC пре апликације 131-I, у односу на контролну групу здравих испитаника, при неспецифичној стимулацији митогеном *in vitro* луче статистички значајно веће концентрације IL-13 и IL-5, односно IL-13, IL-5 и IL-9 (концентрација цитокина/1000 леукоцита). Исто је показано и када су концентрације цитокина прерачунате на 1000 мононуклеарних ћелија (статистички значајно веће концентрације IL-13, IL-5 и IL-9 код пацијената са DTC пре терапије 131-I у односу на контролну групу здравих испитаника, резултати нису приказани). С обзиром на то да наша студија није била дизајнирана тако да се може одредити извор секретованих цитокина, а да неке цитокине (на пример, IL-12, IL-4, IL-5, IL-6) могу лучити и друге, а не само мононуклеарне ћелије крви (234), одредили смо се да прикажемо резултате који су добијени израчунавањем концентрације цитокина на 1000 стимулираних леукоцита.

У односу на контролну групу здравих испитаника, при неспецифичној стимулацији ћелија пуне крви пацијената са DTC детектована је статистички значајно већа концентрација два Th2 цитокина (IL-13 и IL-5), као и IL-9 (који је најпре описан као Th2 цитокин, а данас се издваја у посебну групу Th9 цитокина) (235). У бројним радовима анализирана је улога Th2 цитокина у анти-туморском имунском одговору (236-239) или дејство Th2 цитокина на туморске ћелије (240). Високе концентрације Th2 цитокина су детектоване у туморској микросредини и периферној крви пацијената са карциномом простате и мокраћне бешике (241,242). У серуму пацијената са планоцелуларним карциномом главе и врата Spaganо и сарадници (236) су испитивали концентрације одабраних Th1 и Th2 цитокина и показали да пацијенти са III и IV стадијумом тумора имају мање концентрације IL-12 и веће концентрације IL-10 у односу на пацијенте у I и II стадијуму болести. У експерименталним анималним моделима показано је да недостатак ST2 молекула или интерлеукина 33 (IL-33) који поларизује наивне T лимфоците да синтетишу IL-4, IL-5 и IL-13 (Th2 цитокине) води појачању анти-туморског имунског одговора (239,243).

IL-5 могу синтетисати активисани T лимфоцити, мастоцити или NK ћелије, а његово основно биолошко дејство је стимулација продукције еозинофилних леукоцита у костној сржи, као и регулација преживљавања и активације еозинофилних леукоцита (244). Улога IL-5 и еозинофилних леукоцита у анти-туморском имунском одговору недовољно је испитана. Присуство еозинофилних леукоцита у перитуморском инфилтрату показана је у бројним туморима (карциному колона, планоцелуларном карциному, плућном аденокарциному, карциному мокраћне бешике) и обично је повезано са бољом прогнозом (ревијски приказано у референци: 245).

У експерименталним анималним моделима показано је да еозинофилни леукоцити активисани IL-5 супримирају раст хепатоцелуларног карцинома *in vivo* и *in vitro* (237),



односно да еозинофилни леукоцити *in vitro* могу директно убити ћелије генетски модификованог мишијег фибросаркома (238). Сем тога, показано је и да тумор-специфични CD4+ Т лимфоцити са цитокинским Th2 профилем могу уклонити успостављене плућне и висцералне метастазе меланома и да је при том индукована дегранулација еозинофилних леукоцита у туморском ткиву (246).

С обзиром на то да два цитокина, IL-13 и IL-4, који припадају Th2 типу цитокина, али их луче и друге ћелије, имају заједничке, али и различите рецепторе, њихова појединачна улога у имунском надзору тумора недовољно је разјашњена (247). До сада је добро документовано да IL-4 углавном има негативан ефекат на раст тумора (248, 249, 250), док су подаци о улози IL-13 контрадикторни (251-253). Према резултатима радова који се односе на антитуморско дејство IL-13, тај ефекат је највероватније посредован акумулацијом неутрофилних леукоцита и макрофага (251,252), мада се ни дејство IL-13 преко еозинофилних леукоцита не може искључити (247).

IL-9 је првобитно описан као Th2 цитокин, и многа његова дејства слична су дејству IL-4 (235). У присуству цитокина IL-4 и TGF- $\beta$ , Th0 и Th2 лимфоцити могу диферентовати у Th9 лимфоците који секретују интерлеукине IL-9 и IL-10.

Осим Th9 лимфоцита, под одређеним условима и друге субпопулације Т лимфоцита могу секретовати IL-9. Улога IL-9 у патогенези аутоимунских болести добро је документована (ревијски приказано у референци 235), а недавно је показано и да има важну улогу у анти-туморском имунском одговору (254).

Према литературним подацима, код нелечених пацијената са различитим малигним туморима постоји поремећај равнотеже између Th1 и Th2 лимфоцита: инхибиција Th1 лимфоцита локалном продукцијом IL-10, и стимулација Th2 лимфоцита (105,220,234, 236,241,256). Процена баланса контрарегулаторних цитокина (Th1/Th2) код пацијената са DTC пре 131-I терапије у односу на контролну групу здравих испитаника вршена је на

основу концентрација цитокина које су измерене у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви (на 1000 леукоцита).

Анализом односа IL-12p70/IL-13, IFN- $\gamma$ /IL-4, IFN- $\gamma$ /IL-5, IFN- $\gamma$ /IL-10, TNF- $\alpha$ /IL-4, TNF- $\alpha$ /IL-5 и TNF- $\alpha$ /IL-10 показано је да нема статистички значајне разлике између односа тестираних Th1 и Th2 цитокина у групи пацијената са DTC пре терапије 131-I у односу контролну групу здравих испитаника. Иако је у супернатантима фитохемаглутинином стимулисане пуне крви код DTC пацијената показано статистички значајно повећање концентрација IL-13 и IL-5 у односу на контролну групу здравих испитаника, код DTC пацијената су повећане и концентрације Th1 цитокина, тако да однос тестираних Th1 и Th2 цитокина остаје непромењен. Pellegrini (220) је код пацијената са колоректалним карциномом показао промену равнотеже између Th1 и Th2 лимфоцита, али он сматра да је поремећен однос између Th1 и Th2 лимфоцита настао посредством IL-4. У неким студијама (104,257) је показано да особе са туморима имају повећан капацитет продукције и секреције Th2 цитокина и процентуални удео Th2 лимфоцита међу CD4+ Т лимфоцитима.

Пошто је стимулација ћелија пуне крви у нашим експериментима урађена *in vitro*, добијени резултати могу само да нам укажу на то да ће при неспецифичној стимулацији код DTC пацијената Th2 (односно Th2/Th9) тип цитокина бити подстакнут. При том, не бисмо могли да кажемо да ли се тај резултат може повезати са смањеним имунским одговором организма на туморе (који није у могућности да се супротстави настанку малигног тумора), или можда делу имунског одговора који је подстакнут присуством тумора, односно туморским антигенима.

Укупне концентрације свих мерених цитокина у супернатантима фитохемаглутинином стимулираних ћелија пуне крви после терапије 131-I биле су мање у односу на концентрације пре терапије, са статистички значајним разликама за 6

мерених цитокина (IL-17A, IL-2, IL-10, IL-6, IL-13 и IL-5). Када су концентрације цитокина измерене у супернатантима фитохемаглутинином стимулисане пуне крви помножене фактором разблажења и прерачунате на 1000 стимулираних леукоцита, добијено је статистички значајно смањење концентрације Th2 цитокина (IL-13, IL-4 и IL-5). Ови резултати нам указују на то да је смањење концентрације неких цитокина (IL-17A, IL-2, IL-10, IL-6) детектовано после терапије 131-I последица смањења броја леукоцита, а смањење концентрације других цитокина (IL-13, IL-5), бар делом, проузроковано смањењем капацитета лучења тих цитокина од стране *in vitro* стимулираних леукоцита, а не само смањењем броја ћелија, које су показали и други аутори (255).

Резултати раније публикованих студија које су урађене на анималним моделима, у којима су анализирани узорци ткива (118,119), указују на то да јонизујуће зрачење изазива диференцијацију наивних CD4+ Т лимфоцита у Th2 лимфоците и повећање продукције Th2 цитокина. У нашем раду показано је смањење концентрације Th2 цитокина у супернатанту фитохемаглутином стимулисане пуне крви пацијената са DTC 7 дана након апликације 131-I.

Процена баланса контрарегулаторних цитокина (Th1/Th2) код пацијената са DTC после 131-I терапије вршена је на основу концентрација цитокина које су измерене у супернатантима митогеном стимулираних ћелија пуне крви (на 1000 леукоцита). Анализом односа IL-12p70/IL-13, IFN- $\gamma$ /IL-4, IFN- $\gamma$ /IL-5, IFN- $\gamma$ /IL-10, TNF- $\alpha$ /IL-4, TNF- $\alpha$ /IL-5 и TNF- $\alpha$ /IL-10 показано је да нема статистички значајне разлике између односа тестираних Th1 и Th2 цитокина код пацијената са DTC после у односу на вредности пре терапије 131-I. Иако је у супернатантима фитохемаглутинином стимулисане пуне крви пацијената са DTC после терапије 131-I показано статистички значајно смањење

концентрација IL-13, IL-4 и IL-5 у односу на вредности пре терапије, однос тестираних Th1 и Th2 цитокина после терапије 131-I остаје непромењен.

Наши резултати нису сагласни са раније публикованим резултатима који се односе на ефекте јонизујућег зрачења на поларизацију CD4+ Т лимфоцита и секрецију цитокина, а добијени су на анималним моделима (117-119). Према резултатима једне студије (120), зрачење код мишева нарушава равнотежу између Th1 и Th2 лимфоцита и смањује однос између те две субпопулације ћелија. У тумачењу добијених резултата, аутори су претпоставили да смањење лучења Th1 цитокина може настати услед инхибиције продукције IL-12 од стране антиген презентујућих ћелија, или услед смањене секреција биолошки активног IL-12, или услед нисходне регулације експресије рецептора за IL-12 на површини CD4+ Т лимфоцита (117). Кад је у питању повећана продукција IL-4, а сматра се да је IL-4 главни покретач пострадијационе запаљењске реакције (121), непосредно након озрачивања IL-4 би могао да буде продукован од стране Th2 лимфоцита (122), а касније и од стране других IL-4 продукујућих ћелија, пре свега макрофага (122) и мастоцита (123).

Насупрот томе, у нашем раду је после апликације радиоактивног 131-I код пацијената са DTC показано смањење капацитета лучења и укупне секреције Th2 цитокина. Разлике између наших и раније публикованих резултата могле би да се објасне разликама у дизајну студија: у анималним моделима концентрације цитокина мерене су у узорцима ткива (слезине, интестиналне мукозе) озрачених мишева (117-119) а у нашој студији концентрације цитокина мерене су у супернатанту митогеном стимулисане пуне крви *in vitro*.

С обзиром на то да је повећана секреција Th2 цитокина код пацијената са DTC показана пре апликације радиоактивног 131-I, а смањење секреције Th2 цитокина код истих пацијената 7 дана после апликације 131-I, и да су цитокини мерени у

супернатантима фитохемаглутинином стимулисане пуне крви *in vitro*, о значају добијених резултата можемо само спекулисати. Међутим, ако имамо у виду да Th1 цитокини подстичу активацију цитотоксичних Т лимфоцита, НК ћелија, макрофага, и других ћелија које имају важну улогу у имунском надзору тумора (105), повећана концентрација Th2 цитокина код особа са DTC могла би да укаже на измењену/ослабљену одбрану од тумора, док би апликација радиоактивног <sup>131</sup>I праћена смањењем продукције и смањењем капацитета лучења Th2 цитокина, могла да води појачању имунског одговора на тумор. Уколико би овакви резултати добили потврду при анализи перитуморског инфилтрата или серумских концентрација цитокина код пацијената са DTC, смањење секреције Th2 цитокина после апликације <sup>131</sup>I могло би да буде још један користан ефекат терапије радиоактивним јодом пацијената са диферентованим тиреоидним карциномом.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата може се закључити следеће:

1. Оксидативни стрес интензивираан је код пацијената са DTC, а примена радиоактивног I-131 индукује додатни оксидативни стрес.

- Код пацијената са DTC постоји статистички значајно већа концентрација MDA и мокраћне киселине у односу на контролне испитанике, док је TAS сличан код обе групе испитаника.
- MDA достиже највећу вредност три дана након апликације 131-I. Повећање концентрације MDA праћено је смањењем концентрације мокраћне киселине, уз незнатне промене тоталног антиоксидативног статуса.
- Не постоји разлика у интензитету оксидативног стреса између групе пацијената којима је апликовано 3.7 GBq и групе пацијената којима је апликовано 5.5 GBq радиоактивног 131-I.
- Интензитет оксидативног стреса позитивно корелира са ретенцијом радиоактивног 131-I у пределу тиреоидне ложе.

2. Код пацијената са DTC повећана је геномска нестабилност, коју одражава повећана фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви. Након апликације 131-I настају додатна генетска оштећења, са повећањем фреквенце микронуклеуса и смањењем пролиферационог капацитета ћелија.

- Фреквенца микронуклеуса већа је код пацијената са DTC пре терапије 131-I него у контролној групи здравих испитаника.

- Апликација  $^{131}\text{I}$  проузрокује повећање фреквенце микронуклеуса, уз смањење пролиферационог капацитета ћелија.
- Пол, старост, пушење и хистолошки тип тумора не утичу на фреквенцу микронуклеуса код пацијената са ДТС.
- Код пацијената са метастазама, фреквенца микронуклеуса позитивно корелира са акумулацијом  $^{131}\text{I}$  у региону тиреоидне ложе.

3. У односу на здраве особе, лимфоцити ДТС пацијената подложнији су спонтаној апоптози. Апликација радиоактивног  $^{131}\text{I}$  индукује додатну апоптозу лимфоцита.

- Процент лимфоцита у раној фази апоптозе већи је код пацијената са ДТС него у контролној групи здравих испитаника.
- Након апликације  $^{131}\text{I}$  повећава се проценат лимфоцита у раној фази апоптозе и укупан проценат апоптотичних лимфоцита, док проценат лимфоцита у касној фази апоптозе и проценат некротичних ћелија остаје непромењен.
- Радиоактивним јодом индукована рана апоптоза позитивно корелира са радиоактивним јодом индукованом микронуклеусном фреквенцом.

4. Терапија  $^{131}\text{I}$  праћена је смањењем броја свих целуларних елемената периферне крви. На дејство јонизујућег зрачења најосетљивија је субпопулација CD19+ В лимфоцита, чије смањење корелира са повећањем броја ћелија у раној фази апоптозе.

5. Код пацијената са ДТС серумске концентрације цитокина: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-22 и TNF- $\alpha$ , углавном су немерљиве, а терапија радиоактивним  $^{131}\text{I}$  не индукује повећање њихове серумске концентрације.

6. Ћелије периферне крви пацијената са DTC при неспецифичној стимулацији фитохемаглутинином *in vitro* луче веће концентрације Th2 цитокина (IL-13 и IL-5) и IL-9 у односу на контролну групу здравих испитаника. Терапија радиоактивним 131-I праћена је смањеним капацитетом ћелија да при неспецифичној стимулацији фитохемаглутинином *in vitro* секретују Th2 цитокине (IL-13, IL-4 и IL-5) .

7. Терапија радиоактивним 131-I праћена је променама серумске концентрације протеина и липида.

- Код пацијената са DTC повећане су концентрације протеина, холестерола и триглицерида у односу на контролну групу здравих испитаника.
- После апликације 131-I код DTC пацијената долази до значајног смањења серумске концентрације протеина и холестерола, које је праћено повећањем концентрације триглицерида три дана након терапије 131-I .
- Код DTC пацијената старијих од 50 година постоји негативна корелација између концентрације протеина и триглицерида.

Укупан закључак овог истраживања је да код пацијената са DTC пре терапије радиоактивним 131-I постоји појачан оксидативни стрес, повећана геномска нестабилност и спонтана апоптоза лимфоцита периферне крви, као и извесно фаворизовање лучења Th2 цитокина у одговору на неспецифичну стимулацију. Терапија радиоактивним 131-I индукује повећање оксидативног стреса, генских оштећења и апоптозе, смањење броја свих целуларних елемената крви, а нарочито В лимфоцита, и смањено лучење Th2 цитокина у одговору на неспецифичну стимулацију *in vitro*.



## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clinical Oncology* 2010;22:395–404.
2. Kebebew E, Clark OH. Differentiated thyroid cancer: “complete” rational approach. *World J Surg* 2000;24:942–951.
3. Kolfoy BA, Zheng T, Holford TR, *et al.* International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer causes Control* 2009;20:525–31.
4. Ćurčin N, Mihaljević O, Jeftić I, *et al.* Diferentovani karcinomi štitaste žlezde - epidemiologija, etiopatogeneza, dijagnostika i terapijske smernice. *Medicinski časopis, in press.*
5. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;361:501-511.
6. van Tol KM, de Vries EGE, Dullaart RPF, Links TP. Differentiated thyroid carcinoma in the elderly. *Critical Reviews in Oncology:Hematology* 2001;38:79–91.
7. Živančević-Simonović S, Mijatović-Teodorović Lj. In: Ilić M. *Maligni tumori-odabrana poglavlja*. 1st ed. Kragujevac: Interprint, 2012:498-543.
8. Nam M, Chu YC, Choe W, *et al.* Metastatic follicular thyroid carcinoma to the thymus in a 35-year-old woman. *Yonsei Medical Journal* 2002;43(5):665-669.
9. Vrndić O, Savin S, Mijatović Lj, Djukić A, Jeftić I, MD,1 Zivancević Simonović S. Concentration of thyroglobulin and thyroglobulin-specific autoantibodies in patients with differentiated thyroid cancer after treatment with radioactive iodine 131. *Labmedicine* 2011;42(1):9-13.
10. De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev* 2000;80:1083–1105.

11. Caron NR, Clark OH. Well differentiated thyroid cancer. *Scandinavian journal of surgery* 2004;93(4):261-71
12. DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:414-423.
13. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2006;16(2):1-33.
14. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, *et al.* Revised american thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1167–1214.
15. Luster M, Clarke SE, Dietlein M, *et al.* Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35:1941-1959.
16. Woodrum DT, Gauger PG. Role of <sup>131</sup>I in the treatment of well differentiated thyroid cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2005;89:114–121.
17. Mazzaferri EL. Thyroid remnant <sup>131</sup>I ablation for papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 1997;7:265-271.
18. Vrachimis A, Schober O, Riemann B. Radioiodine remnant ablation in differentiated thyroid cancer after combined endogenous and exogenous TSH stimulation. *Nuklearmedizin* 2012;51(3):67-72.
19. Luster M, Lippi F, Jarzab B, *et al.* rhTSH-aided radioiodine ablation and treatment of differentiated thyroid carcinoma: a comprehensive review. *Endocrine Related Cancer* 2005;12(1):49-64.

20. Ravishankar U, Pande S, and Savita N. I-131 in the management of differentiated thyroid cancer – an update on current recommendations and practices. *Apollo Medicine* 2009;6(4):347-354.
21. Savin S, Cvejic D, Mijatovic Lj, Zivancevic Simonovic S. Measuring thyroglobulin concentrations in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Med Biochem* 2010;29:245 –253.
22. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91:31S-38S.
23. Close GL, Ashton TA, McArdie A, MacLaren DP. The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comparative Biochem And Phys* 2005;142:257-66.
24. Ralph S, Rodriguez-Enriquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sanchez R. The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation – why mitochondria are targets for cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine* 2010;31:145-170.
25. Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595–603.
26. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad Biol Med* 1999;26:1034–1053.
27. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 1997;6:391–397.
28. Ferrari CKB. Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *Int Med J* 2001;8:175-184.

29. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 2005;38:1103–1111.
30. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, and Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology* 2001;54:356-361.
31. Denisov ET, Afanasev IB. *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. Boca Raton, London, New York, Singapore:Taylor&Francis group, 2005.
32. Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 2005;49(11):1044-9.
33. Kagan VE. *Lipid peroxidation in biomembranes*. Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton 1988.
34. Mono T, Shinohara R, Iwase K, *et al*. Changes in free radical scavengers and lipid peroxide in thyroid glands of various thyroid disorders. *Horm Metab Res* 1997;29: 351-354.
35. Gorozhanskaya EG, Sviridova SP, Dobrovolskaya MM, Zubrikhina GN, Kashiya ShR. Selenium and oxidative stress in cancer patients. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2013;7(1):32-39.
36. Alkhenizan A, Hafez K. The role of vitamin E in the prevention of cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals Saudi Med* 2007;27:409-414.
37. Sener DE, Gönenç A, Akinci M, and Torun M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochemistry and Function* 2007;25:377-382.
38. Di Giacomo C, Acquaviva R, Lanteri R, *et al*. Nonproteic antioxidant status in plasma of subjects with colon cancer. *Experimental Biology and Medicine* 2003;228:525-528.
39. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoib J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *IFEBIS Letters* 1995;358:1-3.

40. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991;51(3):794-8.
41. Sato K, Ito K, Kohara H, Yamaguchi Y, *et al.* Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 1992;12 (6): 2525-2533.
42. Warburg O."On the origin of cancer cells". *Science* 1956;123(3191):309–14.
43. Singh KK. Mitochondrial dysfunction is a common phenotype in aging and cancer. *Ann NY Acad Sci* 2004;1019:260–264.
44. Laurent A, Nicco C, Chereau C, *et al.* Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2005;65:948–956.
45. Copeland WC, Wachsman JT, Johnson FM, and Penta JS. Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest* 2002;20:557–569.
46. Arnold R, Shi J, Murad E, *et al.* Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98: 5550- 5.
47. Pustovidko AV, Podselueva MM, Evtodinko YV. Generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and its modulation by calcium ions during tumor growth. *IUBMB Life* 2000;50:69-73.
48. Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. *Oral Oncol* 1999;35:272-77.
49. Kasapovic J, Pejic S, Todorovic A, *et al.* Antioxidant status in breast cancer patients of different ages after radiotherapy. *Arch Biol Sci Belgrade* 2009;61:23-8.
50. Chitra S, Shyamaladevi CS. Effect of  $\alpha$ -tocopherol on pro-oxidant and antioxidant enzyme status in radiation-treated oral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Sci* 2008;62:141-148.

51. Gupta A, Bhatt MLB, Misra MK. Assessment of free radical-mediated damage in head and neck squamous cell carcinoma patients and after treatment with radiotherapy. *Indian J Biochem Biophys* 2010;47:96-99.
52. Cartmel B, Bowen D, Ross D, Johnson E, Mayne ST. A randomized trial of an intervention to increase fruit and vegetable intake in curatively treated patients with early-stage of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14: 2848-54.
53. Malathi M, Vijay M, Shivashankara AR. The Role of oxidative stress and the effect of radiotherapy on the plasma oxidant-antioxidant status in head and neck cancer. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2011;5(2):249-251.
54. Iyer R, and Lehnert BE. Factors underlying the cell growth-related bystander response to a particles. *Cancer Res* 2000;60:1290–1298.
55. Yoon YS, Lee JH, Hwang SC, Choi KS, and Yoon G. TGF beta1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells. *Oncogene* 2005;24:1895–1903.
56. Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23(3-4):311-22.
57. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, *et al.* Human Micronucleus project. "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures." *Mutat Res* 2003;534(1-2):65-75.
58. Bombail V, Aw D, Gordon E, Batty J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 2001;44(3):383-92.

59. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993;285(1):35-44.
60. Saunders WS, Shuster M, Huang X, *et al.* Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:303-308.
61. Fenech M, and Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985;147:29-36.
62. Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutation Research* 2001;491:9–16.
63. Beetstra S, Salisbury C, Turner J, *et al.* Lymphocytes of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers, with or without breast cancer, are not abnormally sensitive to the chromosome damaging effect of moderate folate deficiency. *Carcinogenesis* 2006;27:517-524.
64. Solomon E, Borrow J, and Goddard AD. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 1991;254:1153–1160.
65. Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, *et al.* Micronucleus assay in-vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: the updated analysis. *Int J Radiat Biol* 2001;77:631–636.
66. Venkatachalam P, Paul S, Mohankumar M, *et al.* Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Mutat Res* 1999;425:1–8.
67. Norppa H, Luomahaara S, Heikanen H, *et al.* Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environ Health Perspect* 1993;101:139-43.

68. Murgia E, Ballardini M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat Res* 2008;639(1-2):27-34.
69. Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsiere T, Bonassi S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis, *Mutat Res* 2008;659:274–283.
70. Milošević-Djordjević O, Grujičić D, Vasković Ž, Marinković D. High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. *Tohoku J of Med Exp* 2010;220:115-120.
71. Baciuchka-Palmaro M, Orsiere T, Duffaud F, *et al.* Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients. *Mutat Res* 2002;520:189–198.
72. Duffaud F, Orsiere T, Villani P, *et al.* Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis* 1997;12:227–231.
73. Fenech M, Denham J, Francis W, Morley A. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 1990;57:373–383.
74. Pala FS, Alkaya F, Tabakcioglu K, *et al.* The effects of micronuclei with whole chromosomes on biological dose estimation. *Turk J Biol* 2008;32:283–290.
75. Thierens H, Vral A, De Ridder L, *et al.* Scoring of different cytogenetic endpoints after in vitro low dose c-exposure: interlaboratory comparison for biomonitoring of radiological workers. *Int J Radiat Biol* 1999;75:23–34.
76. Ramirez MJ, Surrallés J, Galofre P, Creus A, and Marcos R. Radioactive iodine induces clastogenic and age-dependent aneugenic effects in lymphocytes of thyroid cancer patients as revealed by interphase FISH. *Mutagenesis* 1997;12(6):449-455.



77. Willems P, Claes K, Baeyens A, *et al.* Polymorphisms in non homologous end-joining genes associated with breast cancer risk and chromosomal radiosensitivity. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;47:137-148.
78. Palyvoda O, Polańska J, Wygoda A, and Rzeszowska-Wolny J. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochimica Polonica* 2003;50(1):181-190.
79. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
80. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 2000;45:528-537.
81. Fadok VA, De Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. The loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276:1071-7.
82. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
83. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000;243:167-190.
84. Knight RA and Melino G. Cell death in disease: from 2010 onwards. *Cell Death Dis* 2011;2:e202.
85. Rastogi RP, Richa, Sinha RP. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal* 2009;8:155-181.
86. Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, *et al.* Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 2001;488(3):211-31.

87. Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihito T, *et al.* Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 2002;8:2553-2562.
88. Muneaki S, Tachibana M, Dhar DK, *et al.* Spontaneous apoptosis in advanced esophageal carcinoma: its relation to Fas expression. *Clin Cancer Res* 2000;6:4755-4759.
89. Kupryjanczyk J, Dansonka- Mieszkowska A, Szymanska T, *et al.* Spontaneous apoptosis in ovarian carcinomas: a positive association with p53 gene mutation is dependent on growth fraction. *Br J Cancer* 2000;82:579-583.
90. Mandoky L, Syende B, Geczi L, *et al.* Apoptosis regulation and spontaneous apoptosis index of testicular germ cell tumors are associated with differentiation and resistance to systemic treatment. *Anticancer Res* 2008;28:1641-1650.
91. Pinzon-Charry A, Maxwell T, MCGuckin MA, *et al.* Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006;8:R5.
92. Saito T, Dworacki G, Gooding W, Lotze MT, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of CD8+ T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:1351-1364.
93. Xu JL, Lai R, Kinoshita T, Nakashima N, Nagasaka T. Proliferation, apoptosis, and intratumoral vascularity in multiple myeloma: correlation with the clinical stage and cytological grade. *J Clin Pathol* 2002;55:530-534.
94. Gastman BR, Atarashi Y, Reichert TE, *et al.* Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res* 1999;59:5356–5364.
95. Lowel SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 1999;21:485-495.

96. Djurdjevic P, Zelen I, Ristic P, *et al.* Role of decreased production of interleukin-10 and interferon-gamma in spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia lymphocytes *in vitro*. Archives of Medical Research 2009;40(5):357-363.
97. Bordón E, Hernández LA, Lara PC, *et al.* Prediction of clinical toxicity in localized cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs). Radiat Oncol 2009;4:58-64.
98. Pinar B, Henríquez-Hernández LA, Lara PC, *et al.* Radiation induced apoptosis and initial DNA damage are inversely related in locally advanced breast cancer patients. Radiat Oncol 2010;5:85-89.
99. Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. Endocrine-Related Cancer 1999;6:41-44.
100. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol 1989;7:145-173.
101. Kidd P: Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern Med Rev 2003;8:223- 246.
102. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology, 5<sup>th</sup> ed., Saunders, 2003.
103. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. Immunity 2006;25:195-201.
104. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. Nat Immunol 2000;1:199-205.
105. Shurin MR, Lu L, Kalinski P, *et al.* Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. Springer Semin Immunopathol 1999;21:339-359.
106. Sato M, Goto S, Kaneko R, *et al.* Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients. Anticancer Res 1998;18:3951-3955.

- 107.** Zamarron BF, Chen WJ. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci* 2011;7:651-658.
- 108.** Wilke CM, Kryczek I, Wei S, *et al.* Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis* 2011;32:643– 649.
- 109.** Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, *et al.* Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009;114:1141–1149.
- 110.** Derhovanessian E, Adams V, Hahnel K, *et al.* Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. *Int J Cancer* 2009;125(6):1372-9.
- 111.** Zhang YL, Li J, Mo HY, *et al.* Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. *Mol Cancer* 2010;9:4.
- 112.** Радосављевић ГД, Јовановић ИП, Кањевац ТВ, Арсенијевић НН. Улога регулаторних Т лимфоцита у модулацији имунског одговора на малигне ћелије. *Srp Arh Celok Lek* 2013;141:262-267.
- 113.** Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, *et al.* Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis* 2011;28(5):451-462.
- 114.** Kawaida H, Kono K, Takahashi A, *et al.* Distribution of CD4+CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *J Surg Res* 2005;124(1):151-157.
- 115.** Suttmuller RPM, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, *et al.* Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of Cd25<sup>+</sup> regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001;194:823–832.

- 116.** Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting Edge: Regulatory T cells induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- $\beta$ . *J. Immunol* 2007;178:6725- 6729.
- 117.** Park HR, Jo SK, Paik SG. Factors effecting the Th2-like immune response after gamma-irradiation: low production of IL-12 heterodimer in antigen-presenting cells and small expression of the IL-12 receptor in T cells. *Int J Radiat Biol* 2005;81: 221-231.
- 118.** Han SK, Song JY, Yun YS, Yi SY. Effect of gamma radiation on cytokine expression and cytokine-receptor mediated STAT activation. *Int J Radiat Biol* 2006; 82:686-697.
- 119.** Gremy O, Benderitter M, Linard C. Caffeic acid phenethyl ester modifies the Th1/Th2 balance in ileal mucosa after gamma-irradiation in the rat by modulating the cytokine pattern. *World J Gastroenterol* 2006;12:4996-5004.
- 120.** Bass H, Mosmann T, Strober S. Evidence for mouse Th1- and Th2-like helper T cells in vivo. Selective reduction of Th1-like cells after total lymphoid irradiation. *Journal of Experimental Medicine* 1989;170:1495-1511.
- 121.** Westermann W, Schobi R, Rieber EP, Frank KH. Th2 cells as effectors in postirradiation pulmonary damage preceding fibrosis in the rat. *International Journal of Radiation Biology* 1999;75:629-638.
- 122.** Huang M, Wang J, Lee P, *et al.* Human nonsmall cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res* 1995;55:3847-3853.
- 123.** Buttner C, Skupin A, Reimann T, *et al.* Local production of interleukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats. Macrophages as predominant source of interleukin-4. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1997;17:315-325.

124. Aldenborg F, Nilsson K, Jarlshammar B, Bjermer I, Enerback L. Mast cells and biogenic amines in radiation-induced pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1993;8:112-117.
125. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-310.
126. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84:407-412.
127. Fenech M. The in vitro micronucleus assay. *Mutat Res* 2000;455:81-95.
128. Boyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:51-76.
129. Shounan Y, Feng X, and O'Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1998; 217:61-70.
130. Kallmann BA, Hüther M, Tubes M, *et al.* Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease. *Diabetes* 1997;46:237-243.
131. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007;39:44–84.
132. Stevanović J, Borozan S, Jović S, Ignjatović I. Fiziologija slobodnih radikala, *Vet. glasnik* 2011;65 (1-2):95-107.

133. Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, *et al.* Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med* 2012;53:260-270.
134. Riley PA: Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994;65:27-33.
135. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:316–328.
136. Davies KJ, Seranian A, Muakkassah KFS, Hoshhstein P. Uric acid- iron complex. A new aspect of the antioxidant function of uric acid. *Biochem J* 1986;235:747-754.
137. Abiaka C, Al-Awadi F, Al-Sayer H, *et al.* Serum antioxidant and cholesterol levels in patients with different types of cancer. *J Clin Lab Anal* 2001;15:324-330.
138. Du ZX, Zhang HY, Meng X, Guan Y, Wang HQ. Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. *BMC Cancer* 2009;9:56–67.
139. Erdamar H, Cimen B, Gülcemal H, Saraymen R, Yerer B, Demirci H. Increased lipid peroxidation and impaired enzymatic antioxidant defense mechanism in thyroid tissue with multinodular goiter and papillary carcinoma. *Clin Biochem* 2010;43:650–654.
140. Laatikainen LE, Castellone MD, Hebrant A, *et al.* Extracellular superoxide dismutase is a thyroid differentiation marker downregulated in cancer. *Endocr Rel Cancer* 2010;17:785–796.
141. Akinci M, Kosova F, Cetin B, *et al.* Oxidant/antioxidant balance in patients with thyroid cancer. *Acta Cir Bras* 2008;23:551-554.

142. Sadani GR, Nadkarni GD. Role of tissue antioxidant defence in thyroid cancers. *Cancer Lett* 1996;109:231-235.
143. Young O, Crotty T, O'Connell R, O'Sullivan J, Curran AJ. Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head Neck* 2010;32:750-756.
144. Konukoğlu D, Hatemi HH, Arican S, Demir M, Akcay T. Radioiodine treatment and oxidative stress in thyroidectomised patients for differentiated thyroid cancers. *Pharmacol Res* 1998;8:311-315.
145. Makarewicz J, Lewiński A, Karbownik-Lewińska M. Radioiodine remnant ablation of differentiated thyroid cancer does not further increase oxidative damage to membrane lipids - early effect. *Thyroid Res* 2010;3:7-10.
146. Bartoc R, Dumitrescu C, Belgun M, Olinescu R. Oxidative and antioxidative factors in the serum of thyroid cancer patients treated with <sup>131</sup>I. *Rom J Endocrinol* 1993;31:85-87.
147. Monteiro GO, Oliveira NG, Rodrigues AS, *et al.* Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. *Mutagenesis* 2000;15:69-75.
148. Pereira B, Rosa LF, Safi DA, Bechera ES, Curi R. Control of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase activities in rat lymphoid organs by thyroid hormones. *J Endocrinol* 1994;140:73-77.
149. Torun AN, Kulaksizoglu S, Kulaksizoglu M, Pamuk BO, Isbilen E, Tutuncu NB. Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 2009;70:469-474.
150. Pucci E, Chiovalto L, Pinchera A. Thyroid and lipid metabolism. *Int J Obesity* 2004;24:109-12.
151. Duntas LH, and Biondi B. Short-term hypothyroidism after levothyroxine-withdrawal in patients with differentiated thyroid cancer: clinical and quality of life consequences. *European Journal of Endocrinology* 2007;156:13-19.



152. Gullu S, Sav H, and Kamel N. Effects of levothyroxine treatment on biochemical and hemostasis parameters in patients with hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2005;152:355–61. 145
153. Prakash A, and Lal AK. Serum lipids in hypothyroidism: our experience. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2006;21(2):153-5. 146
154. Wu H, Zuo S, Ma C, *et al.* Short-term overt hypothyroidism affect on lipids after thyroxine-withdrawal in patients with differentiated thyroid carcinoma. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology* 2009;8(11):647-9. 147
155. Sunanda V, Sangeeta S, Prabhakar rao B. Study of lipid profile in hypothyroidism. *Int J Biol Med Res* 2012;3(1):1373-6. 148
156. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* 2000;160(4):526-34.
157. Pearce EN. Hypothyroidism and dyslipidemia: modern concepts and approaches. *Curr Cardiol Rep* 2004;6:451-6.
158. Regalbuto C, Alagona C, Maiorana R, *et al.* Acute changes in clinical parameters and thyroid function peripheral markers follow ing L-T4 withdrawal in patients totally thyroidectomized for thyroid cancer. *J Endocrinol Invest* 2006;29(1):32-40.
159. Saini V, Yadav A, Arora S, Singh R, and Bhattacharjee J. Association between different degrees of hypothyroidism and serum lipids. *Internet Journal of Medical Update* 2012;7(2):3-8.
160. Regmi A, Shah B, Rai BR, and Pandeya A. Serum lipid profile in patients with thyroid disorders in central Nepal. *Nepal Med Coll J* 2010;12(4):253-6.
161. Yilmaz IA, Akçay T, Cakatay U, Telci A, Ataus S, Yalçın VR. Relation between bladder and protein oxidation. *Int Urol Nephrol* 2003;35:345–50.

162. Chandran V, Anitha M, Avinash SS, Rao GM, Shetty BV, Sudha K. Protein oxidation: a potential cause of hypoalbuminemia in oral cancer. *Biomed Res* 2012;23:227-30.
163. Gälman C, Matasconi M, Persson L, Parini P, Angelin B, and Rudling M. Age-induced hypercholesterolemia in the rat relates to reduced elimination but not increased intestinal absorption of cholesterol. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E737–E742.
164. Gesing A, Lewiński A, and Karbownik-Lewińska M. The thyroid gland and the process of aging: what is new? *Thyroid Research* 2012;5:16.
165. Bremner AP, Feddema P, Leedman PJ, *et al.* Age-related changes in thyroid function: a longitudinal study of a community-based cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(5):1554–62.
166. Fenech M, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, *et al.* Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells-a Human Micronucleus (HUMN) project ([www.humn.org](http://www.humn.org)) initiative commencing in 2007. *Mutagenesis* 2007;22: 3-4.
167. Evans HJ, Neary GJ, and Williamson FS. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Int J Radiat Biol* 1959;1:216-229.
168. Livingston GK, Foster AE, Elson HR. Effect of in vivo exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes. *J Toxicol Environ Health* 1993;40:367-375.
169. Watanabe N, Yokoyama K, Kinuya S, *et al.* Radiotoxicity after iodine-131 therapy for thyroid cancer using the micronucleus assay. *J Nucl Med* 1998;39:436–440.
170. Hooman A, Mogharrabi M, Mosaffa N, Tabeie F, Shafiee B, Neshandar AE. Cytological radiotoxicity of radioiodine therapy in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Iranian J Endocrinol Metab* 2008;9:351-356.

171. Bagniet-Mahieu L, Lemaire M, Leonard A, Gerber GB. Chromosome aberrations after treatment with radioactive iodine for thyroid cancer. *Radiat Res* 1994;140:429–431.
172. Gundy S, Katz N, Fuzy M, Esik O. Cytogenetic study of radiation burden in thyroid disease patients treated with external irradiation or radioiodine. *Mutat Res* 1996;360:107-113.
173. Puerto S, Marcos R, Ramírez MJ, Galofré P, Creus A, Surrallés J. Equal induction and persistence of chromosome aberrations involving chromosomes 1, 4 and 10 in thyroid cancer patients treated with radioactive iodine. *Mutat Res* 2000;469:147-158.
174. Ballardín M, Gemignani F, Bodei L, *et al.* Formation of micronuclei and of clastogenic factor(s) in patients receiving therapeutic doses of iodine-131. *Mutat Res* 2002;514:77–85.
175. Gutierrez S, Carbonell E, Galofre P, Xamena N, Creus A, Marcos R. A cytogenetic follow -up study of thyroid cancer patients treated with 131I. *Cancer Letters* 1995;91:199-204.
176. Erselcan T, Sungu S, Ozdemir S, Turgut B, Dogan D, Ozdemir O. Iodine-131 treatment and chromosomal damage: in vivo dose–effect relationship. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 2004;31:676–684.
177. Sigurdson AJ., Hauptmann M, Alexander BH,*et al.* DNA damage among thyroid cancer and multiple cancer cases, controls and long-lived individuals. *Mutat Res* 2005;586:173-188.
178. Joseph LJ, Bhartiya US, Raut YS, Kand P, Hawaldar RW, Nair N. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of thyroid cancer patients after radioiodine therapy and its relationship with metastasis. *Mutat Res* 2009;675: 35-40.
179. Popova L, Hadjidekova V, Hadjieva T, Agova S, Vasilev I. Cytokinesis-block micronucleus test in patients undergoing radioiodine therapy for differentiated thyroid carcinoma. *Hell J Nucl Med* 2005;8:54-57.

- 180.** Jianlin L, Jiliang H, Lifen J, Wei Z, Baohong W, Hongping D. Measuring the genetic damage in cancer patients during radiotherapy with three genetic end-points. *Mutagenesis* 2004;19:457-464.
- 181.** Monsieurs M, Thierens HM, Vral A, Van De Wiele C, De Ridder LI, Dierckx R. Adaptive response in patients treated with <sup>131</sup>I. *J Nucl Med* 2000;41:17-22.
- 182.** Kita T, Yokoyama K, Higuchi T, *et al.* Multifactorial analyses on the short-time side effects occurring within 96 hours after radioiodine-131 therapy for differentiated thyroid carcinoma. *Ann Nucl Med* 2004;18:345-349.
- 183.** Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X irradiation. *Mutat Res* 1986;161:193-198.
- 184.** Fenech M, Neville S, Rinaldi J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat Res* 1994;313:203-207.
- 185.** Touil N, Aka PV, Buchet JP, Thierens H, Kirsch-Volders M. Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis* 2002;17(3):223-32.
- 186.** Bonassi S, Neri M, Lando C, *et al.* Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutation Research* 2003;543:155-166.
- 187.** Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, and De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging* 2012;4(5):330-349.
- 188.** Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999;96:245-54.

189. Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* 2012;28(3):128-36.
190. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1999;47(9):1101-1109.
191. Bursch W, Paffel S, Putz B, Barthel G, and Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 1990;11(5):847-853.
192. Guo GZ, Sasai K, Oya N, *et al.* Simultaneous evaluation of radiation-induced apoptosis and micronuclei in five cell lines. *Int J Radiat Biol* 1998;73:297-302.
193. Belyakov OV, Prise KM, Trott KR, Michael BD. Delayed lethality, apoptosis and micronuclei formation in human fibroblast irradiated with X-rays or  $\alpha$ -particles. *Int J Radiat Biol* 1999;75:985-993.
194. Simko M, Kriehuber R, Weiss DG, Luben RA. Effects of 50Hz EMF exposure on micronucleus formation and apoptosis in transformed and non transformed human cell line. *Bioelectromagnetics* 1998;19:85-91.
195. Liu Z, Huang WY, Li XS, *et al.* Prediction value of radiosensitivity of hepatocarcinoma cells for apoptosis and micronucleus assay. *World J Gastroenterol* 2005;11:7036-7039.
196. Utani K, Konho Y, Okamoto A, Shimizu N. Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress. *PLoS ONE* 2010;5:e10089.
197. Crompton NEA, Shi Y, Emery GC, *et al.* Sources of variation in patient response to radiation treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:547-554.
198. Solomon WL, Meehan KA, Gihwala D, Slabbert JP. Leukocyte apoptosis and micronuclei induction in individuals with varying sensitivity to ionizing radiation. *Medical Technol SA* 2010;24:29-32.

- 199.** Decordier I, Dillen L, Cundari E, Kirsch-Volders M. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagen* 2002;17:337-344.
- 200.** Meintieres S, Biola A, Pallardym M, Marzin D. Using CTLL-2 and CTLL-2 bcl2 cells to avoid interference by apoptosis in the in vitro micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 2003;41:14-27.
- 201.** Fenech M, Crott J, Turner J, Brow S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 1999;14:605-612.
- 202.** Van Nostrand D. The benefits and risks of I-131 therapy in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1381-91.
- 203.** Sönmez B, Doğan İ, Yavruoğlu C, Can G, Sönmez M. The changes in complete blood count in thyroid cancer patients treated with radioactive iodine ablation therapy. *Turk J Hematol* 2010;27:269-74.
- 204.** Keldsen N, Mortensen BT, Hansen HS. Haematological effects from radioiodine treatment of thyroid carcinoma. *Acta Oncol* 1990;29:1035-9.
- 205.** Grunwald F, Schomburg A, Menzel C, *et al.* Changes in the blood picture after radioiodine therapy of thyroid cancer. *Med Klin (Munich)* 1994;89:522-8.
- 206.** Molinaro E, Leboeuf R, Shue B, *et al.* Mild decreases in white blood cell and platelet counts are present one year after radioactive iodine remnant ablation. *Thyroid* 2009;19:1035-41.
- 207.** Vrndic O, Milosevic-Djordjevic O, Djurdjevic P, *et al.* Radioiodine therapy accelerates apoptosis in peripheral blood lymphocytes of patients with differentiated thyroid cancer. *Neoplasma* 2013;60(5):568-575.

- 208.** Rosário PW, Borges MA & Purisch S. Preparation with recombinant human thyroid-stimulating hormone for thyroid remnant ablation with <sup>131</sup>I is associated with lowered radiotoxicity. *J Nucl Med* 2008;49:1776-82.
- 209.** Lloyd DC & Dolphin GW. Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes. *Occup Environ Med* 1977;34:261-73.
- 210.** Prosser JS. Survival of human T and B lymphocytes after X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 1976;30:459-65.
- 211.** Bauernhofer T, Kuss I, Henderson B, Baum AS, Whiteside TL. Preferential apoptosis of CD56<sup>dim</sup> natural killer cell subset in patients with cancer. *Eur J Immunol* 2003;33:119-24.
- 212.** Hossain S, Bhimani C, Chen Z, *et al.* Comparison of native and adaptive immunity profiles of healthy volunteers and patients with well-differentiated thyroid cancer. *ASCO Meeting Abstr* 2011;29:5585.
- 213.** Botella-Carretero JJ, Prados A, Manzano L, *et al.* The effect of thyroid hormones on circulating markers of cell-mediated immune response, as studied in patients with differentiated thyroid carcinoma before and during thyroxine withdrawal. *Eur J Endocrinol* 2005;153:223-30.
- 214.** Whiteside TL & Herberman RB. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* 1995;7:704-10.
- 215.** Wulff S, Pries R, Borngen K, Trenkle T, Wollenberg B. Decreased levels of circulating regulatory NK cells in patients with head and neck cancer throughout all tumor stages. *Anticancer Res* 2009;29:3053-8.
- 216.** Blomgren H, Wasserman J, Littbrand B. Blood lymphocytes after radiation therapy of carcinoma of prostate and urinary bladder. *Acta Radiol (Therapy Phys Biol)* 1974;13:357-367.

- 217.** Martinon F, Major A, Tschopp J. The inflammasomes guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2008;27:229-265.
- 218.** Balua AC, Simon A, Maddipati R, *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* 2011;208:519-533.
- 219.** Okunieff P, Chen V, Maguire DJ, Huser AK. Molecular markers of radiation-related normal tissue toxicity. *Cancer Metastasis Res* 2008;27:363-374.
- 220.** Pellegrini P, Berghella AM, Del Berto T, *et al.* Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression. *Cancer Immunol Immunother* 1996;42:1-6.
- 221.** Kozlowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, Wojtukiewicz MZ. Concentrations of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Bialymst* 2003;48:82-84.
- 222.** Guney N, Soydinc HO, Basaran M, *et al.* Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 in Turkish patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2009;10:669-674.
- 223.** Yamazaki K, Yamo T, Kameyama T, *et al.* Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenoma. *Surgery* 2002;131:S236-241.
- 224.** Kim MJ, Jang JW, Oh BS, *et al.* Change in inflammatory cytokine profiles after transarterial chemotherapy in patients with hepatocellular carcinoma. *Cytokine* 2013;64:516-522.
- 225.** Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, *et al.* Interleukin-6: a marker of thyroid destructive processes? *J Clin Endocrinol Metabol* 1994;79:1424-1427.



- 226.** Murai H, Murakami S, Ishida K, Sugawara M. Elevated serum interleukin-6 and decreased thyroid hormone levels in postoperative patients and effects of IL-6 on thyroid cell function in vitro. *Thyroid* 1996;6:601-606.
- 227.** Özata M, Ergun H, Özişik G, *et al.* Effect of radioiodine therapy on several hematological and immune parameters in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism* 2000;2:45-50.
- 228.** O'Hanlon DM, Lynch J, Cormican M, Given HF. The acute phase response in breast carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:1289–93.
- 229.** Alexandrakis MG, Passam FH, Moschandrea IA, *et al.* Levels of serum cytokines and acute phase proteins in patients with essential and cancer-related thrombocytosis. *Am J Clin Oncol* 2003;26:135–40.
- 230.** Jabs WJ, Busse M, Kruger S, *et al.* Expression of C-reactive protein by renal cell carcinomas and unaffected surrounding renal tissue. *Kidney Int* 2005;68:2103–10.
- 231.** Nozoe T, Korenaga D, Futatsugi M, *et al.* Immunohistochemical expression of C reactive protein in squamous cell carcinoma of the esophagus—significance as a tumor marker. *Cancer Lett* 2003;192:89–95.
- 232.** Wigmore SJ, Fearon KC, Sangster K, *et al.* Cytokine regulation of constitutive production of interleukin-8 and -6 by human pancreatic cancer cell lines and serum cytokine concentrations in patients with pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2002;21:881–6.
- 233.** Lehrer S, Diamond EJ, Mamkin B, *et al.* C-reactive protein is significantly associated with prostate-specific antigen and metastatic disease in prostate cancer. *BJU Int* 2005;95:961-2.
- 234.** Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:532–562.

- 235.** Li H, Rostami A. IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4+ T cells and implications for autoimmunity. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010;5(2):198-209.
- 236.** Sparano A, Lathers DMR, Achille N, Petruzzelli GJ, Young MRI. Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 2004;131:573– 576.
- 237.** Kataoka S, Konishi Y, Nishio Y, Fujikawa-Adachi K, Tominaga A. Antitumor activity of eosinophils activated by IL-5 and eotaxin against hepatocellular carcinoma. *DNA Cell Biol* 2004;23(9):549-60.
- 238.** Simson L, Ellyard JI, Dent LA, *et al.* Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J Immunol* 2007;178:4222 - 4229.
- 239.** Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Arsenijevic NN, Lukic ML. IL-33/ST2 axis in innate and acquired immunity to tumors. *Oncoimmunology* 2012;1(2):229-231.
- 240.** Hallett MA, Venmar KT, Fingleton B. Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13. *Cancer Res* 2012;72:6338-6343.
- 241.** Elsasser-Beile U, Kolble N, Grussenmeyer T, *et al.* Th1 and Th2 cytokine response patterns in leukocyte cultures of patients with urinary bladder, renal cell and prostate carcinomas. *Tumour Biol* 1998;19:470–6.
- 242.** Wise GJ, Marella VK, Talluri G, Shirazian D. Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer. *J Urol* 2000;164:722–5.
- 243.** Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, *et al.* ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol* 2011;41(7):1902-12.
- 244.** Fujisawa T, Terada A, Atsuta J, Iguchi K, Kamiya H, Sakurai M. IL-5 as a strong secretagogue for human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114(1):81–83.

- 245.** Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S, Capron M. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61(9):1527-34.
- 246.** Mattes J, Hulett M, Xie W, *et al.* Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med* 2003;197: 387–393.
- 247.** Ellyard JI, Simson L, Parish CR. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* 2007;70(1):1-11.
- 248.** Modesti A, Masuelli L, Modica A, *et al.* Ultrastructural evidence of the mechanisms responsible for interleukin-4-activated rejection of a spontaneous murine adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1993;53:988–93.
- 249.** Musiani P, Allione A, Modica A, *et al.* Role of neutrophils and lymphocytes in inhibition of a mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IFN-alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha. *Lab Invest* 1996;74:146–57.
- 250.** Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 1992;257:548–51.
- 251.** Lebel-Binay S, Laguerre B, Quintin-Colonna F, *et al.* Experimental gene therapy of cancer using tumor cells engineered to secrete interleukin-13. *Eur J Immunol* 1995;25:2340–8.
- 252.** Ma HL, Whitters MJ, Jacobson BA, Donaldson DD, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K. Tumor cells secreting IL-13 but not IL-13Ralpha2 fusion protein have reduced tumorigenicity in vivo. *Int Immunol* 2004;16:1009–17.
- 253.** Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, *et al.* NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 2000;1:515–20.
- 254.** Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med* 2012;18:1248-1253.

- 255.** Jones BM, Kwok CCH, Kung AWC. Effect of radioactive iodine on cytokine production in Graves disease: transient increases in interleukin 4 (IL-4), IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor- $\alpha$ , with longer term increases in interferon- $\gamma$  production. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4106-4110.
- 256.** Ito N, Nakamura H, Tanaka Y, Ohgi S. Lung carcinoma: analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry. *Cancer* 1999;85:2359-236.
- 257.** Mori T, Takada R, Watanabe R, Okamoto S, Ikeda Y. T-helper Th/1Th2 imbalance in patients with previously untreated B-cell diffuse large cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:566-568.

