



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта : АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТА ПЕРИФЕРНЕ КРВИ И ФРЕКВЕНЦИЈА МИКРОНУКЛЕУСА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ДИФЕРЕНТОВАНИМ КАРЦИНОМОМ ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ КОЈИ СУ ЛЕЧЕНИ РАДИОАКТИВНИМ ЈОДОМ 131

Кључне речи : диферентовани карциноми штитасте жлезде, јод 131, лимфоцити, апоптоза, микронуклеуси, оксидативни стрес, цитокини

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Карциноми штитасте жлезде су најчешћи малигни тумори ендокриног система. У терапији диферентованих карцинома штитасте жлезде (DTC) примењују се велике дозе радиоактивног јода 131 (^{131}I), с циљем да се елиминишу преостале (малигне и нормалне) тиреоидне ћелије. Радиоактивни ^{131}I се крвљу транспортује до штитасте жлезде и у њој концентрише. При том долази до емитовања бета и гама зрачења, тако да системска радионуклидна терапија предствља добар модел за испитивање ефеката продуженог дејства великих доза јонизујућег зрачења у *in vivo* условима.

Очекиван ефекат примене великих доза радиоактивног јода је јонизација праћена оксидативним стресом и ослобађањем неких цитокина, као и оштећење ћелијских макромолекула уз повећање фреквенције микронуклеуса, а можда и индукција апоптозе лимфоцита периферне крви. Учесталост апоптозе лимфоцита периферне крви код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде није испитивана ни пре, нити после терапијске апликације ^{131}I .

Циљ истраживања:

Основни циљ истраживања је да се код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде испита апоптоза лимфоцита периферне крви паралелно са фреквенцијом микронуклеуса пре и седам дана након апликације великих доза (3.7 или 5.5 GBq) радиоактивног ^{131}I , као и да се проценат апоптотичних лимфоцита и фреквенција микронуклеуса анализира у односу на интензитет оксидативног стреса, цитокински профил (у серуму испитаника), концентрацију тиреоглобулина и тиреоидни статус.

У складу са основним циљем поставили смо и посебне циљеве:

Циљ 1. Испитати да ли постоји разлика у проценту апоптотичних лимфоцита и фреквенци микронуклеуса између **групе пацијената са DTC пре апликације ^{131}I и контролне групе** здравих испитаника.



Циљ 2. Испитати да ли постоји разлика у проценту апоптотичних лимфоцита и фреквенци микронуклеуса у групи пацијената са DTC пре и седам дана након апликације ^{131}I .

Циљ 3. Испитати да ли постоји корелација између процента апоптотичних лимфоцита седам дана после терапије ^{131}I и дозе апликованог ^{131}I , интензитета оксидативног стреса, концентрације мерених цитокина, концентрације тиреоглобулина и тироидног статуса испитаника.

Циљ 4. Испитати да ли постоји корелација између фреквенце микронуклеуса седам дана после терапије ^{131}I и дозе апликованог ^{131}I , интензитета оксидативног стреса, концентрације мерених цитокина, концентрације тиреоглобулина и тироидног статуса испитаника.

Циљ 5. Испитати да ли постоји корелација између процента апоптотичних лимфоцита и фреквенције микронуклеуса код пацијената са DTC пре и након апликације ^{131}I .

Актуелност истраживања

Карциноми штитасте жлезде чине око 1–2% свих малигних тумора (1). То су најчешћи тумори ендокриног система (око 95%), а њихова инциденца се у току протеклих тридесетак година повећала у многим земљама (2). Од свих малигних тумора штитасте жлезде, око 90% су добродиферентовани тумори (папиларни и фоликуларни карциноми). С обзиром на то да су ћелије добродиферентованих тиреоидних карцинома задржале способност акумулације јода, после оперативног лечења пацијентима се у циљу аблације остатка тиреоидног ткива апликује радиоактивни ^{131}I (90% терапијског ефекта остварује се β^- , а 10% γ зрачењем) чије је полувреме распада 8 дана (3). Системска радионуклидна терапија представља добар модел за испитивање пролонгираног дејства јонизујућег зрачења у *in vivo* условима. Очекивани ефекат примене великих доза радиоактивног ^{131}I је јонизација материје праћена стварањем слободних радикала и настанком оксидативног стреса (4). Иако у литератури постоји велики број радова који се односе на оксидативни стрес проузрокован јонизујућим зрачењем уопште (4, 5, 6, 7), оксидативни стрес проузрокован пролонгираним дејством јонизујућег зрачења приликом примене радионуклидне терапије (^{131}I) недовољно је испитан. Најновији радови указују на то да оксидативни стрес може да подстакне ослобађање IL-1 γ и IL-18 (8), односно TNF и IL-6 (9), као и да неки цитокини могу бити маркери радијационог оштећења ћелија/ткива (10). Према нашим сазнањима, до сада је публикован само један рад који се односи на продукцију цитокина након терапијске примене радиоактивног јода ^{131}I (11) код пацијената са Graves-овом болешћу који су лечени знатно мањим дозама радиоактивног јода ^{131}I . У том раду је показано повећање концентрације IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α и IFN- γ , али се мора имати у виду чињеница да се ради о аутоимунској болести, са могуће другачијим цитокинским профилем него код тиреоидног карцинома.

У оксидативном стресу који је проузрокован јонизујућим зрачењем настаје оштећење ћелијских макромолекула: протеина, липида и ДНК. Микронуклеуси представљају крајњи ефекат оштећења ДНК и маркер су генотоксичног дејства јонизујућег зрачења (12), а одређивање фреквенције микронуклеуса (engl. cytokinesis-blocked micronucleus assay, CBMN assay) је стандардни тест за детекцију хромозомских оштећења и нестабилности генома у молекуларним и цитогенетским студијама (13). Микронуклеуси представљају фрагменте хромозома или целе хромозоме који су издвојени у току митозе и у цитоплазми ћерки ћелија уочавају се као мало, додатно једро. Могу се детектовати и у лимфоцитима периферне крви здравих особа, а њихов број је повећан код особа са различитим туморима (14). Осим повећања



фреквенције микронуклеуса, код особа са неким туморима (главе и врата, малигног меланома) показано је и повећање апоптозе лимфоцита периферне крви непосредно након њиховог издвајања (15, 16, 17, 18). С обзиром на то да се апоптозом уклањају неке ћелије са непоправљивим генетским оштећењем (19, 20, 21), као и да агенси који индукују хромозомске аберације изазивају повећано стварање микронуклеуса и стимулишу апоптозу (22, 23) уклањање оштећених ћелија процесом апоптозе може да утиче на фреквенцију детектованих микронуклеуса.

Фреквенција микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви особа са диферентованим карциномима штитасте жлезде испитивана је у базалним условима, као и након апликације радиоактивног јода ^{131}I (12, 24), док апоптоза лимфоцита непосредно након издвајања из периферне крви особа са карциномом штитасте жлезде није испитивана ни у базалним условима, нити након примене радиојодне терапије.

Предмет и опис истраживања: задаци, методологија, очекивани резултати

Испитивана популација:

Пацијенти: У студију ће бити укључено 24 пацијента оба пола, који су оперисани од тумора штитасте жлезде и код којих је патохистолошки потврђена дијагноза добродиферентованог карцинома штитасте жлезде (папиларни или фоликуларни карцином), а упућени су у Центар за нуклеарну медицину КЦ Крагујевац ради апликације радиоактивног ^{131}I . У студији ће бити коришћен „згодни” узорак (испитаници које задовољавају критеријуме за укључивање биће укључивани узастопно).

Критеријуми за укључивање: (1) постављена дијагноза папиларног или фоликуларног карцинома штитасте жлезде, (2) да је пацијент оперисан и да је конзилијарно донета одлука о апликацији радиоактивног ^{131}I , (3) хипотиреоидно стање пацијента, односно концентрација TSH већа од 30 mIU/L и (4) потписан формулар информисаног пристанка после детаљног информисања пацијента о студији.

Критеријуми за искључивање: (1) пацијенти млађи од 18 година, (2) пацијенти са акутним инфекцијама (до месец дана пре апликације ^{131}I), (3) раније дијагностификоване и/или лечене аутоимунске болести, (4) раније дијагностификоване и/или лечене хроничне инфламаторне болести и (5) раније дијагностификовани и/или лечени други малигни тумори, односно примењена зрачна или хемиотерапија.

Контролна група: Здрави добровољци који немају раније дијагностификоване туморе, акутне или хроничне 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.

Узимање узорака крви

Од свих испитаника ће венепункцијом бити узето по 10ml крви на следећи начин: у вакум епрувету која садржи антикоагуланс (0,5 ml хепарина) узеће се 4 ml крви, одакле ће бити изоловане ћелије које ће се користити за испитивање процеса апоптозе, 4 ml крви у епрувету без антикоагуланса, за издвајање серума и одређивање концентрације цитокина и параметара оксидативног стреса, и 2 ml крви бризгалицом која садржи антикоагуланс за одређивање



фреквенце микронуклеуса. Крв ће се узимати непосредно пре примене аблационе дозе радиоактивног јода ^{131}I (0 дан) и седмог дана после примене ^{131}I (7. дан).

Апоптоза лимфоцита периферне крви

Апоптоза лимфоцита периферне крви биће одређивана помоћу проточног цитометра применом Annexin V-FITC/7-AAD Kit комплета (Beckman Coulter, France) методом двоструког бојења флуоресцентним бојама Анексин V и 7-амино-актиномицин D (7-ADD) вијабилном бојом.

Фреквенца микронуклеуса

Учесталост микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви биће анализирана применом Fenech-овог „Citokinezis blok mikronukleus testa“ (CBMN) након инкубације од 72h и третмана култура Citohalazin B 44h од почетка култивације.

Тиреоидни статус и тиреоглобулин

Концентрација слободног тироксина (fT4), слободног тријодторонина (fT3) и тиреостимулишућег хормона (TSH), тиреоглобулина (Tg) и анти-тиреоглобулинских антитела (TgAt) одређиваће се стандардним дијагностичким тестовима фирме *Cis Biointernational* (Француска) према упутству произвођача, у лабораторији Центра за нуклеарну медицину КЦ Крагујевац.

Параметри оксидативног стреса

У серуму пацијената непосредно пре и седмог дана после апликације радиоактивног јода, као и у серуму здравих испитаника, биће одређивана концентрација малонил диалдехида (TBA методом) и укупног антиоксидативног капацитета (RANDOX методом).

Одређивање концентрације цитокина

Концентрација цитокина (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-22, TNF- α ,) биће одређивана у серуму пацијената непосредно пре и седам дана после апликације ^{131}I , као и у серуму здравих испитаника, методом проточне цитометрије, применом BMS817FF e-Bioscience кита.

Статистичка обрада података

За статистичку обраду података користиће се SPSS пакет, верзија 13.0. Подаци ће бити анализирани применом батерије статистичких тестова- Студентов T тест и упарени T тест, односно Mann Whitney и Wilcoxon-ов тест за случај неправилне расподеле. Међусобна повезаност посматраних варијабли и јачина везе биће испитана тестовима линеарне регресије и корелације (одређивањем Pearson/Spearman коефицијената). Резултати ће се сматрати статистички значајним уколико је $p < 0.05$.

Очекивани резултати:

Очекујемо да код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде пре апликације ^{131}I ростоји изванредан ниво апоптозе лимфоцита крви и већи број микронуклеуса у односу на контролну групу, а да ће се проценат апоптотичних ћелија и фреквенција микронуклеуса



повећати после радионуклидне терапије ^{131}I , а после апликације ^{131}I очекујемо настанак оксидативног стреса и повећање серумске концентрације неких проинфламаторних цитокина.

Значај истраживања

Значај ове студије је што ће се по први пут паралелно испитати проценат апоптотичних лимфоцита и фреквенција микронуклеуса у крви пацијената са DTC који су лечени радиоактивним ^{131}I упоредо са другим анализираним параметрима, што ће допринети разумевању промена које се дешавају у лимфоцитима особа изложених познатим и великим дозама радиоактивног јода.

Временски оквир

Истраживање ће се спровести у периоду од 12 до 18 месеци.

Литература

1. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clinical Oncology* 2010, 22:395–404.
2. 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.
3. 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.
4. Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994, 65:27–33.
5. Wolfram RW, Budinsky AC, Palumbo B, Palumbo R, and Helmut Sinzinger H. Radioiodine Therapy Induces Dose-Dependent In Vivo Oxidation Injury: Evidence by Increased Isoprostane 8-Epi-PGF2 α . *J Nucl Med* 2002; 43:1254–1258.
6. 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 Review* 2004, 23:311–322.
7. De Luca C, Deeva I, Mariani S, Maiani G, Stancato A, and Korkina L. Monitoring antioxidant defenses and free radical production in space-flight, aviation and railway engine operators, for the prevention and treatment of oxidative stress, immunological impairment, and pre-mature cell aging. *Toxicology and Industrial Health* 2009; 25: 259 – 267.
8. Martinon F, Major A and Tschopp. The inflammasomes guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2008, 27: 229–265.
9. Balua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim K-Y, Sack MN, Kastner DL, Siegel RM. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNF1-associated periodic synrome (TRAPS). *J Exp Med* 2011, 208:519–533.



10. Okunieff P, Chen V, Maguire DJ, Huser AK. Molecular markers of radiation-related normal tissue toxicity. *Cancer Metastasis Res* 2008, 27: 363-374.
11. 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- α , with longer term increases in interferon- γ production. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:4106-4110.
12. Monteiro Gil O, Oliveira NG, Rodrigues AS, Laires A, Ferreira TC, Limbert E, Leonard A, Gerber G and Rueff J. Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. *Mutagenesis* 2000, 15: 69-75.
13. Fenech M, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmüller S, Holland N. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells—a Human Micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in 2007. *Mutagenesis* 2007; 22: 3-4.
14. Milosevic Djordjevic O, Grujicic D, Vaskovic Z, Marinkovic D. High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. *Tahoku J Exp Med*. 2010, 220: 115-120.
15. Saito T, Kuss I, Dworacki G, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with head and neck cancer. *Clinical Cancer Research* 1999, 5:1263-1273.
16. Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2002, 8:3137-3145.
17. Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihiro T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clinical Cancer Research* 2002, 8:2553-2562.
18. Saito T, Dworacki G, Gooding W, Lotze MT, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of CD8+ T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. *Clinical Cancer Research* 2000, 6: 1351-1364.
19. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995, 267:1456-1462.
20. Mitsiades CS, Poulaki V, Mitsiades N. The role of apoptosis-inducing receptors of the tumor necrosis factor family in thyroid cancer. *J Endocrinol* 2003, 178:205-216.
21. Decordier I, Cundari E, Kirsch-Volders M. Influence of caspase activity on micronuclei detection: a possible role for caspase-3 in micronucleation. *Mutagenesis* 2005, 20:173-179.
22. Elhajouji A, Van Hummelen P, Kirsch-Volders M. Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, Jan 1995; 26(4): 292-304.
23. Elhajouji A, Tibaldi F, Kirsch-Volders M. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors *in vitro* in human lymphocytes. *Mutagenesis*, May 1997; 12: 133 - 140.



24. Gutierrez S, Carbonell E, Galofrea 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.