

СТРУМОГЕНИ НОДУСИ ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ КАО ПОСЛЕДИЦА ИЗМЕЊЕНЕ АПОПТОЗЕ И НАЈЧЕШЋЕ МЕТОДЕ ОДРЕЂИВАЊА

Аритоновић Прибаковић Ј.¹, Марковић Љ.²

¹Клиника за инфективне болести, Медицински факултет Приштини, Косовска Митровица

²Институт за патолошку физиологију, Медицински факултет, Београд

GOITERS NODES THYROID GLAND AS A RESULT OF MODIFIED APOPTOSIS AND METHODS FOR DETERMINING

Аритоновић Прибаковић Ј.¹, Марковић Љ.²

¹Clinic of Infectious diseases, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

²Institute of Pathophysiology, Medical faculty, Belgrade

SUMMARY

Hyperplasia in goiter may be associated with altered apoptosis thyrocytes. There are numerous techniques for the detection and quantification of apoptosis. Some of them were light microscopy, electron microscopy, flow cytometry, studying the activities of caspase, DNA fragmentation and so on. In patients with multinodular endemic goiter after six months of iodine load, number of apoptotic thyrocytes increased by ten times, Bcl-2 is missing and Bax appeared in thyrocytes. Excess iodine in molecular form causes apoptosis in thyrocytes creating free radicals, mitochondrial damage and release of cytochrome c. Research shows that the level of sFas in the serum of patients with multinodular goiter increased compared to normal controls, it can still point to the reduced expression of Fas protein on the surface of cells that then leads to increased thyroid cell proliferation. Further study of apoptosis in goiter combined morphological and biochemical methods are important for better diagnosis and treatment of diseases.

Key words: goiter; apoptosis; fragmentation DNA-detection

САЖЕТАК

Хиперплазија у струми може бити повезана са измењеном апоптозом тироцита. Постоје бројне технике за детекцију и квантификацију апоптозе. Неке од њих су светлосна микроскопија, електронска микроскопија, проточна цитометрија, испитивање активности каспаза, фрагментације ДНК итд. Код пацијената са мултинодуларном ендемском струмом после шестомесечног оптерећења јодом број апоптотичних тироцита се повећао за десет пута, Bcl-2 је нестао а Bax се појавио у тироцитима. Вишак јода у молекулском облику изазива апоптозу у тироцитима, стварањем слободних радикала, општењем митохондрија и ослобађањем цитохрома Ц. Истраживања показују да је ниво sFas у серуму код пацијената са мултинодуларном струмом повећан у односу на нормалне контроле, то даље може да укаже на смањену експресију Fas протеина на површини ћелије које онда доводи до повећања пролиферације тироцита. Даља испитивања апоптозе у струми комбинацијом више морфолошких и биохемијских метода су од значаја ради боље дијагностике и лечења обољења.

Кључне речи: струма; апоптоза; фрагментација ДНК-детекција

Увод

Хиперплазија у струми може бити повезана са измењеном апоптозом тироцита (1). Апоптоза (грчки - *απόπτωση* = опадање лишћа у јесен) је морфолошки израз програмиране ћелијске смрти. У нормалним физиолошким условима у људском организму дневно апоптозом приближно умире сто милијарди ћелија, али размножавањем ћелија толико их и настаје (2).

Поред тога што је битна за одржавање хомеостаза у организму, последњих десетак година, велики број патолошких стања повезује се са успореним или убрзаним процесом апоптозе. Тако истраживања вршена на пацијентима са мултинодуларном ендемском струмом показују да после шестомесечног оптерећења јодом број апоптотичних тироцита се повећао за десет пута, Bcl-2 је нестао а Bax се појавио у тироцитима (3).

Новија истраживања истичу улогу апоптозе у етиологији и патогенези честих болести људи, попут обољења срца, атеросклерозе, хипертензије (4), шећерне болести (5), болести јетре (2) итд. Од посебног значаја је за стање имунолошке нереактивности на сопствене антигене, јер нерегулисана, појачана апоптоза може бити узрок разним аутоимуним болестима, као што је Хашимот-ов тироидитис (6,7). С друге стране, малигни тумори са неконтролисаним ћелијским растом могу бити последица недовољне или спречене апоптозе (8).

Постоје два главна пута за одвијање апоптозе: спољашњи и унутрашњи.

Код спољашњег пута (death receptor - DR pathway), апоптоза започиње ангажовањем рецептора породице тумор некротишућег фактора (ТНФРс): ТНФР1, Фас, ДР 3-6 (9,10,11). Главни регулаторни протеини уну-

трашњег пута су протеини Bcl-2 породице. Протеини Bcl-2 породице су митохондријални мембрански протеини и они могу бити анти-апоптотски-штите ћелије спречавањем митохондријалне апоптозе, као што су Bcl-2 и Bcl-xl, или про-апоптотски, који проузрокују митохондријалну апоптозу, као што су Bax и Bak (12). Процес апоптозе се одвија кроз три фазе: започиње тзв. **иницијацијском фазом**, коју покрећу поменути сигнали унутрашњег или спољашњег пута активације (Фас-лиганди, чиниоци некрозе тумора- α (TNF α), недостатак чиниоца раста, отказивање супресорске активности анти-апоптотичних чланова Bcl-2 итд.). Након тога следи **фаза одлучивања**, у којој значајна улога припада каспазама (енгл. Caspases, cysteinyl aspartate-specific proteases), које су одговорне за смишљено разлагање ћелије у апоптотска телашца (13). Протеолитичким кидањем активираних каспаза даље разграђују бројне различите ћелијске протеине (5,14) нпр. делове ћелијског скелета (14) а ендонуклеазе кидају ДНА и тако процес апоптозе улази у **извршну фазу** када долази до карактеристичних морфолошких промена ћелије у апоптози: бубрења ћелијске мембране, смањења волумена ћелије, пикноза и фрагментација ћелијског једра. Ћелија се фрагментује у тзв. апоптотска телашца која садрже кондензовани хроматин једра и наизглед непромењене органеле (2,14).

Технике за детекцију и квантификацију апоптозе

Најраније примењивана техника која се заснивала на откривање апоптозе на основу морфолошких промена ћелије је **светлосна микроскопија**. Бубрење ћелијске мембране, смањивање волумена ћелије, пикноза и фрагментација ћелијског једра могу се видети у хистолошким препаратима обојенима хематоксилином и еозином.

Електронска микроскопија је специфична и осетљива техника, али само као квалитативна метода у откривању апоптозе. **Проточна цитометрија** представља брзу и квантитативну анализу али ниске специфичности. Код ове технике се као узорак користи суспензија ћелија. **Активност каспаза** може се одредити и имунохистохемијским техникама користећи антитела против неопитопа, који се откривају након протеолитичке активације каспаза. Даље, активност каспаза може се детектовати применом антитела која препознају само већ разграђене ћелијске супstrate каспаза. Активацијом апоптотичног пута у већини случајева долази до пораста концентрације ћелијског калцијума. **Промена концентрације ћелијског калцијума** може се детектовати коришћењем индикатора за Ca²⁺ као што је фура-2. **Пад митохондријског потенцијала** може се мерити коришћењем различитих флуоресцентних проба које се накупљају у митохондријама (2).

Фрагментација ДНК се може детектовати помоћу проточне цитометрије, електрофорезом на агарозном гелу, коришћењем ТУНЕЛ методе (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling).

ТУНЕЛ метода се користи за означавање једноструких и двоструких ломова (прекида) ланца ДНК у

тквним препаратима и суспензијама ћелија. Терминална деоксинуклеотидил трансфераза (ТдТ) катализује полимеризацију нуклеотида на 3'ОН крају молекула ДНК, а везивањем дУТП -а обележеног флуоресцином означава се прекид у ланцу ДНК. Ћелије које умиру апоптозом, тј. ћелијска једра са уграђеним флуоресцентним обележивачем у молекулу ДНК, могу се детектовати помоћу флуоресцентног микроскопа или проточног цитометра (2).

За квантификацију интензитета означених места апоптозе користи се дензитометрија.

За *in situ* доказивање ћелијске смрти користи се кит за детекцију. Апоптотична једра се визуализују диаминобензидином. Апоптозу анализирају два независна посматрача користећи сочива која увеличавају. Израчунава се проценат позитивних једара у односу на укупан број тироцитних једара у сваком пољу, као и средња вредност процента апоптозе из 10 поља сваког узорка.

Апоптотичне ћелије се доказују *in situ* означавањем краја фрагментоване ДНК. Парафинисани тквни пресеци (исечци) се депарафинишу ксилолом и етанолом. Пресеци се онда третирају протеиназом К која разлаже протеине у ткиву. Дигоксинин-дУТП се додаје 3'-ОН крајевима ДНК исеченим од стране деоксинуклеотидил трансферазе (ТдТ). После инкубације са анти-дигоксинин антителом везаним за пероксидазу, пресеци (исечци) се боје диаминобензидином (ДАБ) и метил-зеленим (counterstained). Средња процентуална вредност позитивно обојених једара се израчунава после бројања позитивно или негативно обојених једара 500 тироцита у неколико поља под светлосним микроскопом од стране 2 независна посматрача. Позитивна реакција на апоптозу се приказује браон/црном обојеношћу једра или перижерног дела ћелије (1).

Промене пропустљивости ћелијске мембране могу се детектовати комбинацијом анализа морфолошких карактеристика и уласка несталних боја уз примену проточног цитометра. Код ћелија у апоптози фосфатидилсерин се налази на спољашњој страни ћелијске мембране. Новије технике за детекцију **промена на ћелијској мембрани**, одређивањем фосфатидилсерина на ћелијској површини, користе Annexin-V обележеним флуоресцином или биотином (2).

Апоптоза и струма

Основни узрок ендемске струме је недостатак јода у исхрани. Уколико се водом и храном уноси мање од 10 $\mu\text{g}/\text{дан}$ јода, омета се синтеза тироидних хормона, што доводи до појачане секреције ТСХ (15). Ниске концентрације јода су способне да спрече апоптозу, а високе доводе до повећања Фас-индуковане апоптозе (10).

Истраживања вршена на пацијентима са мулти-нодуларном ендемском струмом указују да после шестомесечног оптерећења јодом број апоптотичних тироцита се повећао за десет пута, Bcl-2 је нестао у тироцитима а Bax се појавио у тироцитима (3). Andrioula&Tsatsoulis (16) показују да исхрана богата јодом код пацова доводи до смањења штитасте жлезде. Цитотоксично дејство изазвано јодом на тироцитима пацова

има карактеристике некрозе и апоптозе. Истраживања показују да вишак јода у молекулском облику, настао оксидацијом јодида помоћу ендогене пероксидазе, изазива апоптозу у тироцитима, стварањем слободних радикала, оштећењем митохондрија и ослобађањем цитохрома Ц (10). Новија истраживања показују да је ниво растворљивог облика Фас (сФас) у серуму код пацијената са мултинодуларном струмом повећан у односу на нормалне контроле што даље може да укаже на повећану експресију алтернативно везане ФасмРНК и смањену експресију Фас протеина на површини ћелије што даље може да доведе до повећања пролиферације ћелија штитасте жлезде заштитом ћелија од Фас посредоване апоптозе (11).

Блиски однос између апоптозе и струме код експерименталног модела гушавости пацова подржава истраживања код људи.

Тамура и сарадници у свом раду су експериментално код Wistar пацова индуковали струму, а затим изазвали инволуцију. У овом раду, пацови су храњени ниском концентрацијом јода како би испитивали апоптозу у току формирања струме. Након тога, пацови са потпуно развијеном струмом храњени су са високом концентрацијом јода да би довели до фазе инволуције.

Овај експериментални модел скоро да је подударан клиничком стању ендемске гушавости или уношења струмогена. Апоптотичне ћелије су идентификоване електронском микроскопијом и ТУНЕЛ бојењем. Главни налази овог истраживања су: повећање броја апоптотичних ћелија током развоја струме и у раној фази инволуције, што је потврђено ТУНЕЛ бојењем и електронском микроскопијом. Упоредо са повећаним бројем апоптотичних ћелија, број Фас позитивних тироцита је повећан. Поред тога струма је била повезана са повећаним бројем PCNA (proliferating cell nuclear antigen) позитивних ћелија, иако је њихов број био смањен испод полазног у касној фази инволуције (17).

У експерименталном моделу тироидитиса код Wistar пацова изазваног применом различитих доза калијумјодида експресија Вах протеина је знатно већа код Wistar пацова са експерименталним моделом тироидитиса него у контролној групи што указује да повећана експресија Вах протеина доприноси улози апоптозе у патогенези експерименталног тироидитиса (18).

Хиперплазија може бити повезана са апоптозом тироцита, мада јод и анти тироидни лекови исто тако могу утицати на резултате (1). Vitale и сарадници извештавају да јод индукује апоптозу у људским тироидним ћелијама кроз р53-независни механизам (19). El May MV и сарадници кажу да хронична јодна експозиција индукује апоптозу и некрозу у тироидним фоликуларним ћелијама и доводи до акумулације тироглобулина у везивном ткиву (3).

У нашој студији гледали смо апоптотична једра у тироцитима користећи ТУНЕЛ методу. Процент апоптотичних ћелија био је статистички значајно већи код пацијената са Хашимотовим тироидитисом него код пацијената са Еутироидном струмом (20).

Процент апоптотичних ћелија код пацијената са Еутироидном струмом кретао се око 2.3% (20) што

је мање него код Хашимотовог тироидитиса и статистички не већи од нормалног (1).

Резултати Chen S. и сарадника показују да је ниво Bcl-2 скоро идентичан у Базедовљевој болести и тироидном фоликуларном аденому, али много слабији у Хашимотовом тироидитису док су Фас, Фас-Л и Bcl-2 у Хашимотовом тироидитису и струми готово исти (21).

Проучавајући корелацију између вредности тироидних хормона и процента апоптотичних тироцита A. Bossowski и сарадници у свом раду показују да нема значајне корелације између тироидних хормона и процента тироцита код којих постоји експресија проапоптотских протеина Фас и ФасЛ, код пацијената са Грејвс-Базедовљевог болешћу и Хашимото тироидитисом (7,12).

ЗАКЉУЧАК

Фактори који утичу на апоптозу у струми су бројни. Контрадикторни су ставови како и на који начин они утичу на процес апоптозе у струми.

Карактер и степен поремећаја у механизму апоптозе може да зависи од бројних фактора: услова средине, терапије, типа патологије, фазе активности у којој се болест налази, као и од пола пацијента (14,17,22). Поремећај механизма митохондријалне апоптозе може да одигра важну улогу у патогенези струме или у развоју упалних и аутоимуних процеса. Истраживања указују на то да тироцити имају све делове апоптотског процеса, али су они неактивни у одсуству повољних услова средине. С обзиром да је апоптоза тироцита укључена у процес формирања струме даља испитивања комбинацијом више морфолошких и биохемијских метода, односно одређивањем више параметара за исти узорак чиме се знатно повећава осетљивост и специфичност мерења и квалитетније процењује процес апоптозе у ткивима и ћелијама су од великог значаја ради боље дијагностике и лечења обољења.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hiromatsu Y, Kaku H, Mukai T, Miyake I, Fukutani T, Koga M, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, and Bak expression in thyroid glands from patients with Graves' disease. *Endocrine Journal* 2004;51(4):399-405.
2. Petrik J, Rumora L, Juretić D, Čepelak I. Apoptoza-detekcija i kvantifikacija. *Biochemia medica* 2003;13(3-4):109-17.
3. El May MV, Zekri S, Boubaker S, Ladgham A, El May A. Chronic iodine overload and apoptosis in cold nodules from endemic multinodular goiters. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2005; 82(1-4):69-74.
4. Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis* 2009;14(4):536-48.
5. Paul A, Krijnen J, Simsek S, Niessen W. M. H. Apoptosis in diabetes. *Apoptosis* 2009;14(12):1387-8.
6. Kandror VI, Krainova SI, Kriukova IV, Mkrtumova NA. On the mechanisms of thyrocyte proliferation and death in autoimmune thyroid diseases. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2006; (9-10):56-61.
7. Bossowski A, Czarnocka B, Bardadin K, Stasiak-Barmuta A, Urban M, Dadan J, et al. Identification of apoptotic proteins in thyroid gland from patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmuniti* 2008;41(2):163-73.

8. Letsas KP, Frangou-Lazaridis M, Skyras A, Tsatsoulis A, Malamou-Mitsi V. Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid lesions. *Pathol Int* 2005;55(11):694-702.
9. Sopotyk A, Rogowski F. Apoptosis: its pathophysiology and monitoring. The role of apoptosis in the radioiodine therapy of hyperthyroidism. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2004;7(1):53-8.
10. Tsatsoulis A. The role of apoptosis in thyroid disease. *Minerva Medica* 2002;93(3):169-80.
11. Andriokula M, Kolaitis N, Vartholomatos G, Tsatsoulis A. Serum levels of soluble fas in patients with multinodular goiter. *Immunol Invest* 2009;38(5):398-407.
12. Bossowski A, Czarnocka B, Bardadin K, Urban M, Niedziela M, Dadan J. Analysis of intracellular proapoptotic (Bax, Bak) and antiapoptotic (Bcl-2, Bcl-xl) proteins expression in thyrocytes from young patients with immune and non-immune thyroid disorders. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw* 2007;13(2):63-70.
13. Ji C, Ren F, Ma H, Xu M. The roles of p38MAPK and caspase-3 in DADS-induced apoptosis in human HepG2 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29(1):50.
14. Myshunina TM, Kalinichenko OV, Tron'ko MD. Mechanism of apoptosis in the thyroid cells in thyroid pathology. *Fiziol Zh.* 2009;55(6):90-102.
15. Vulović D. Patološka fiziologija endokrinog sistema (endokrinopatije). U: *Specijalna patološka fiziologija*. Đorđević-Denić G. i ost. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd; 2003. p. 313-84.
16. Andriokula M, Tsatsoulis A. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *European Journal of Endocrinology* 2001;144:561-8.
17. Tamura M, Kimura H, Koji T, Tominaga T, Ashizawa K, Kiri-yama T, et al. Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model goiter. A possible involvement of Fas system. *Endocrinology* 1998;139(8):3646-53.
18. Marković Lj, Todorović J, Stanković G, Radojević S, Gvozdrenović E, Aritonović J, Stupar N, Vojinović Maglić G. Ekspresija Bcl-2 i Bax proteina u žlijezdi štita u eksperimentalnoj tiroiditisi. *Folia Biol. (Krakow)* 2010;58:163-169.
19. Vitale M, Di Matola T, D'Ascoli F, Salzano S, Bogazzi F, Fenzi G, et al. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology* 2000;141:598-605.
20. Aritonović J. Ekspresija proteina uključenih u apoptozu tkiva štitnjače. *Magistarska teza*, Beograd, 2010.
21. Chen S, Fazle Akbar SM, Zhen Z, Luo Y, Deng L, Huang H, et al. Analysis of the expression of Fas, FasL and Bcl-2 in the pathogenesis of autoimmune thyroid disorders. *Cell Mol Immunol* 2004;1(3):224-8.
22. Wang SH, Baker JR. The role of apoptosis in thyroid autoimmunity. *Thyroid* 2007;17(10):975-9.