

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Aleksandar B. Stojšavljević

Metalomika benignih i malignih oboljenja
tiroidne žlezde

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Aleksandar B. Stojšavljević

**Metallomics of benign and malignant diseases of
the thyroid gland**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Mentori:

Dr Dragan Manojlović, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Slavica Borković-Mitić, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

Dr Ivan Paunović, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu,
Klinički Centar Srbije, Centar za endokrinu hirurgiju

Dr Branislav Rovčanin, naučni saradnik
Klinički Centar Srbije, Centar za endokrinu hirurgiju

Datum odbrane: _____

Захвалница

Ova doktorska disertacija realizovana je na Katedri za analitičku hemiju, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Posebno se zahvaljujem svom mentoru dr Draganu Manojloviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta na obezbeđenom zaposlenju, optimizmu i mogućnosti da se bavim naučno-istraživačkim radom iz oblasti kliničke hemije.

Da bi započeta istraživanja imala svoj pravi tok i kvalitet, najveću zahvalnost dugujem dr Mariji Gavrović-Jankulović, mentoru i redovnom profesoru Hemijskog fakulteta na dragocenoj pomoći, bodrenju, kao i na svim pruženim savetima i sugestijama.

Beskrajno se zahvaljujem dr Slavici Borković-Mitić, višem naučnom saradniku sa IBISS-a na predivnoj saradnji, kvalitetno provedenom vremenu, pomoći u teškim trenucima, savetima i sugestijama i psihičkom jačanju.

Veliku zahvalost dugujem dr Branislavu Rovčaninu, naučnom saradniku sa Centra za endokrinu hirurgiju KCS na nesebičnoj pomoći, kvalitetnoj i konstruktivnoj saradnji, podršci i bratskom prijateljstvu.

Želim da se zahvalim starijim i mlađim kolegama iz laboratorije 538, posebno mr Vojinu Krsmanoviću na njegovoj pomoći u lektorstvu i dragom Simketu na optimizmu. Zahvaljujem se i dr Jeleni Mutić na pomoći i vođenju kroz osnovne i master akademske studije.

Zahvalnost takođe dugujem dr Olgi Cvetković, naučnom savetniku IHTM-a na savetima i upućenim lepim rečima.

Verujem da se pravi prijatelj nađe samo jednom u životu. Ja sam tu sreću imao sa mojom Andri. Hvala ti na svemu!

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici, sestrama Amaliji i Aleksandri, tati Branku (čuvenom Bucku) i mojoj najvećoj podršci u životu, mami Tatjani.

Doktorsku disertaciju posvećujem svojoj mami, Tatjani!

LISTA SKRAĆENICA

Bq – bekerel

BRAF - proto-onkogen B-Raf

BT – benigni tumor

CT – kompjuterizovana tomografija (engl. computed tomography)

DIO – jodotironin dejodinaza (engl. iodothyronine deiodinase)

DIT – dijodotirozin

EM – elektromagnetno

eV – elektronvolt

GM – geometrijska srednja vrednost (engl. geometric mean)

GPx – glutation peroksidaza

HT – Hašimotov tiroiditis

ICP – induktivno spregnuta plazma (engl. inductively coupled plasma)

IFN – interferon

IL – interleukin

IQR – interkvartilni opseg (engl. interquartile range)

IR – infracrveno (engl. infrared)

KED – diskriminacija na osnovu kinetičkih energija (engl. kinetic energy discrimination)

KS – koloidna struma

LDA – linearno diskriminantna analiza

LSD – najmanja značajna razlika (engl. least significant difference)

LT4 – levotiroksin (sintetički tiroksin)

m/z – odnos mase i naelektrisanja

M^+ - primarni, jednostruko naelektrisani jon

MIT – monojodotirozin

MS – masena spektrometrija

n – broj uzoraka

OES – optička emisiona spektrometrija

P – percentil

PCA – metoda glavnih komponenti (engl. principal component analysis)

PLS-DA – metoda delimično najmanjih kvadrata sa diskriminativnim pristupom (engl. partial least squares discriminant analysis)

ppq – deo po kvadrilionu (engl. part per quadrillion)

PTH – paratiroidni hormon

PTT – papilarna tiroidna tkiva

r – linearnost kalibracione prave (koeficijent korelacije)

R – recovery

RF – radiofrekventno

rT3 – reverzibilni T3

Sec – selenocistein

SRM – standardni referentni materijal

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

T3 – trijodotironin

T4 – tetrajodotironin (tiroksin)

Tg – tireoglobulin

TNF – faktor nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor)

TNM – Tumor-lymph Nodes-Metastasis

TPO – tiroidna peroksidaza

TRH – tireotropni oslobađajući-hormon (engl. thyrotropin-releasing hormone)

tRNK – transportna ribonukleinska kiselina (RNK)

TrxR – tioredoksin reduktaza

TSH – tireostimulirajući hormon

VIP – varijabilni značaj u rezultatima projekcije (engl. variable importance in projection)

ZTT – zdrava tiroidna tkiva

Izvod

Etiologija tiroidnih oboljenja je nedovoljno proučena i najnoviji literaturni podaci ukazuju da bi metali mogli da igraju ključnu ulogu u patogenezi velikog broja poremećaja, uključujući i bolesti tiroidne žlezde. S tim u vezi, cilj ove studije bio je da se odredi sadržaj esencijalnih i toksičnih metala u zdravim tiroidnim tkivima (ZTT) i napravi komparativna analiza sa sadržajem metala u tiroidnim tkivima sa dijagnostifikovanim benignim i malignim oboljenjima. Dodatni cilj studije bio je sagledavanje metalomike u zavisnosti od bioloških i kliničko-patoloških parametara, kao i pronalaženje najznačajnijeg metala (ili njegovog odnosa sa drugim metalom) koji bi mogao da razdvoji ispitivane grupe i obezbedi informacije o molekulskoj osnovi patofizioloških promena ispitivane bolesti tiroidne žlezde na tkivnom nivou. Uzorci tkiva za analizu metala sakupljeni su nakon operacije tiroidne žlezde. U istraživanju je učestvovalo 200 pacijenata, od toga 21 pacijent sa Hašimotovim tiroiditisom (HT), 62 pacijenta sa koloidnom strumom (KS), 36 pacijenata sa benignim tumorima (BT) i 81 pacijent sa malignim tumorima (70 sa papilarnim karcinomom, 8 sa folikularnim i troje sa medularnim karcinomom). Od svakog pacijenta sa dijagnostifikovanim tumorom uzorkovano je i ZTT sa najveće moguće udaljenosti od primarnog tumora, koji je bio jasno demarkiran ($n = 117$). U svakoj patologiji ispitan je sadržaj metala u zavisnosti od pola, uzrasta, konzumiranja duvana i veličine tiroidnog nodusa. Metalomika papilarnog karcinoma tiroidne žlezde dodatno je ispitana u zavisnosti od patohistološkog (PH) tipa tumora, prethodne istorije tiroidnog oboljenja u porodici, „TNM“ klasifikacije, prisustva invazije tiroidne kapsule, intratiroidne multicentrične diseminacije i retrosternalnog tiroidnog rasta. Uzorci tkiva razoreni su mikrotalasnom digestijom i koncentracija elemenata, mangana (Mn), nikla (Ni), bakra (Cu), cinka (Zn), arsena (As), selen (Se), kadmijuma (Cd), olova (Pb), torijuma (Th) i uranijuma (U) određena je metodom induktivno spregnute plazme sa masenom spektrometrijom (ICP-MS). Za kvantifikaciju metala čije su koncentracije bile veće od $10 \mu\text{g/L}$ dodatno je primenjena metoda induktivno spregnute plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom (ICP-OES). Za obradu dobijenih podataka primenjene su uni- i multivarijantne statističke metode. Pronađeno je da je sadržaj selen u ZTT bio značajno smanjen (i do 15 puta) u poređenju sa drugim populacionim grupama širom sveta, na osnovu čega bi mogla da se istakne deficijencija selen u ispitivanoj grupi srpske populacije. Utvrđeno je da patološka tiroidna tkiva imaju značajno izmenjen sadržaj velikog broja metala u poređenju sa ZTT. Najpromenljiviji sadržaj metala zabeležen je u tkivima

pacijenata sa HT-om. Suprotno, najveća sličnost u sadržaju metala sa kontrolom zabeležena je u tkivima sa BT. Deficit selen bio je karakterističan za svaku tiroidnu patologiju, sa najmanjim vrednostima u malignim tumorima. Arsen se pokazao najznačajnijim elementom u razdvajanju tkiva HT-a od kontrole, Pb u razdvajanju tkiva sa KS od kontrole i Cd u razdvajanju papilarnog karcinoma od kontrole. Utvrđeno je da nodusi manjeg prečnika sadrže povećan sadržaj Ni, što bi mogao da bude značajan podatak za razmatranje nikla kao potencijalnog inicijatora patogeneze KS. Utvrđena negativna korelacija između Pb i Se u tkivima sa KS ($r_s = -0,66$) i između Cd i Se u papilarnim tiroidnim tkivima (PTT) ($r_s = -0,69$) mogla bi da objasni istiskivanje selen iz tkiva sa KS pod uticajem povećanog sadržaja Pb (strumogeni efekat), odnosno antagonistički efekat istiskivanja selen iz PTT pod uticajem povećanog sadržaja Cd. Pb/Se pokazao se pogodnim markerom za razdvajanje tkiva sa KS od kontrole, dok se Cd/Se pokazao pogodnim markerom za razdvajanje PTT od kontrole. Najveći sadržaj Cd pronađen je u T1 stadijumu bolesti papilarnog karcinoma, što bi moglo da ukaže na značaj kadmijuma u inicijaciji kancerogeneze. Jedino su povećani sadržaji Cd i Cd/Se bili u korelaciji sa retrosternalnom lokalizacijom, dok je smanjen sadržaj dva esencijalna metala (Mn i Zn) imao uticaj na razdvajanje PTT sa prisutnom invazijom od tkiva bez invazije tiroidne kapsule. Dobijeni rezultati u ovoj studiji mogli bi da, po prvi put, pruže informacije o molekulskoj osnovi patofizioloških metalomskih promena ispitivane bolesti tiroidee na tkivnom nivou i rasvetle nedovoljno proučenu etiologiju tiroidnih bolesti. Takođe, ovo studija pruža pouzdane informacije o sadržaju dva bitna radioaktivna metala (Th i U) u tkivu tiroidne žlezde nakon bombardovanja Srbije 1999. godine.

Ključne reči: Tiroidna žlezda; Metalomika; Benigna i maligna oboljenja; Etiopatogeneza tiroidne bolesti; Esencijalni i toksični metali; ICP-OES; ICP-MS.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

UDK broj: 543

Abstract

The etiology of thyroid diseases is not very well clarified and the latest literature data indicated that metals could play a key role in the pathogenesis of a great number of disorders, including the thyroid gland diseases. In this regard, the aim of this study was to determine the content of toxic and essential metals in the healthy thyroid tissues (HTTs), as well as to compare the content of metals in tissues with diagnosed benign and malignant thyroid gland diseases. The further aim of this study was to investigate metallomics according to the biological-, clinical- and pathological-parameters, as well as to find the most significant metal (or its ratio to another metal) that could separate examined groups, as well as to provide additional information on the molecular basis of pathophysiological changes of the examined thyroid disease at the tissue's level. Tissue samples for metal analysis were collected after thyroid surgery. The study included 200 patients, of which 21 patients with Hashimoto's thyroiditis (HT), 62 patients with colloid goiter (CG), 36 patients with benign tumors (BTs) and 81 patients with malignant tumors (70 with papillary carcinoma, 8 with follicular and three with medullary thyroid carcinoma). HTT was sampled from each patient with diagnosed tumor from the greatest possible distance from the primary tumor, which was well demarked ($n = 117$). In each pathology, the content of metals was investigated according to sex, age, smoking habits and goiter size. Metallomics of the papillary thyroid carcinoma (PTC) was further examined based on the pathohistological (PH) type of tumor, previous history of any thyroid disease in the family, TNM classification, capsular invasion, intrathyroid dissemination, and the retrosternal thyroid growth. Tissue samples were decomposed by microwave digestion and the concentration of elements, manganese (Mn), nickel (Ni), copper (Cu), zinc (Zn), arsenic (As), selenium (Se), cadmium (Cd), lead (Pb), thorium (Th) and uranium (U) was determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) was additionally used to quantify metals with concentrations higher than 10 $\mu\text{g/L}$. Uni- and multivariate statistical methods were applied for data analysis. It was found that the content of selenium in the HTTs was significantly reduced (up to 15 times) compared to other population groups worldwide, which could highlight the deficiency of Se in the investigated group of Serbian population. It was estimated that pathological thyroid tissues had significantly altered metal's content when compared to the HTTs. The most altered metal's content was found in tissues of patients with the HT. Contrarily, the greatest similarity in metal's

content with HTTs was found in the tissues with BT. A deficit of selenium was found in each thyroid disease, with the lowest values in the malignant tumors. The most significant metal's that separated HT, CG and PTC from the HTTs was As, Pb and Cd, respectively. It was found that nodules with smaller diameter contain an increased content of Ni, which could be a significant finding for the consideration of nickel as a potential initiator of the pathogenesis of CG. The obtained negative correlation between Pb and Se in CG tissues ($r_s = -0,66$), as well as between Cd and Se in papillary thyroid tissues (PTTs) ($r_s = -0,69$), could explain the extrusion of essential Se from the CG tissues under the influence of increased content of Pb (strumogenic effect), i.e. the extrusion of Se from the PTTs under the influence of increased content of Cd (antagonistic effect). Pb/Se ratio proved to be an appropriate marker for the tissue separation of CG from the control, while Cd/Se ratio proved to be an appropriate marker for the separation of PTTs from the control. The highest content of Cd was found on the T1 disease stage of PTC, which could indicate its role in the initiation of cancerogenesis. The increased content of Cd and Cd/Se only had an influence on retrosternal thyroid localization, while the reduced content of two essential metals (Mn and Zn) had an influence on the separation of thyroid tissues with capsular invasion from the tissues without capsular invasion. The results obtained in this study could provide, for the first time, information on the molecular basis of the pathophysiological metallomical changes of the investigated thyroid diseases at tissue's level, and could highlight not very well clarified etiology of thyroid diseases. Also, this study provides reliable information on the content of two important radioactive metals (U and Th) in the thyroid tissues after the war attack on Serbia in 1999.

Keywords: Thyroid gland; Metallomics; Benign/malignant disease; Etiopathogenesis of thyroid disease; Essential and toxic metals; ICP-OES; ICP-MS.

Scientific field: Chemistry

Specific scientific field: Analytical chemistry

UDC number: 543

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Anatomska pozicija tiroidne žlezde i njena uloga.....	3
2.2. Jod i jodna profilaksa u Srbiji	7
2.3. Nodularna prezentacija i tiroidna disfunkcija	8
2.4. Benigni tumor.....	10
2.5. Maligni tumori tiroidne žlezde.....	11
2.5.1. Papilarni karcinom.....	14
2.5.2. Folikularni karcinom	16
2.5.3. Anaplastični karcinom.....	17
2.5.4. Medularni karcinom	17
2.6. Klinički značaj metalomike.....	18
2.6.1. Priprema kliničkih uzoraka.....	19
2.6.2. Induktivno spregnuta plazma.....	20
3. EKSPERIMENTALNI DEO	28
3.1. Sakupljanje uzoraka tkiva	28
3.2. Hemikalije i instrumenti.....	29
3.3. Optimizacija i validacija ICP-MS metode	31
3.4. Mikrotalasna priprema uzorka	32
3.5. Statistička analiza.....	33
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	34
4.1. Zdrava tiroidna tkiva	34
4.2. Hašimotov tiroiditis.....	43

4.3. Koloidne strume	52
4.4. Benigni tumori (adenomi)	62
4.5. Maligni tumori.....	66
4.6. Komparivna analiza svih patoloških stanja (entiteta)	80
6. ZAKLJUČAK.....	85
7. REFERENCE.....	87

1. UVOD

Interesovanje za ispitivanje metala u biološkim materijalima otvorilo je jednu potpuno novu oblast istraživanja u kliničkoj hemiji – metalomiku. Veliki broj naučno-istraživačkih studija u poslednjih nekoliko decenija ukazao je da sadržaj esencijalnih i toksičnih metala može da bude značajno izmenjen u patološkim stanjima. Zbog primarne ili sekundarne uloge metala u širokom spektru bolesti, metalomika danas sve više dobija na značaju u medicini i biohemiji.

Kliničko istraživanje nema veliki značaj bez prethodno definisanog algoritma. Uzorak se mora sakupljati na odgovarajući/propisani način, adekvatno transportovati i čuvati do analize. Analiza metala u tkivnom materijalu predstavlja veliki izazov kako zbog bogatog (kompleksnog) sastava tako i zbog male polazne mase uzorka i potencijalne infektivnosti. S obzirom da se svaki biološki materijal tretira kao da je infektivan, eksperimentalni rad se pojednostavljuje što je više moguće. Drugi razlog je kontaminacija uzorka sa metalima iz laboratorijskog okruženja. Ovo je posebno važno za metale koji se u uzorku nalaze u ultra-tragovima. Dobra laboratorijska praksa u radu sa metalima podrazumeva korišćenje specijalizovanih prostorija za pripremu uzoraka i upotrebu reagenasa visokog stepena čistoće. Razvojem analitičkih tehnika koje se zasnivaju na induktivno spregnutoj plazmi značajno je smanjena granica detekcije za sve metale od interesa, a zbog skraćenog vremena analize, visoke osetljivosti i multielementarne analize, ove tehnike sve više dobijaju na popularnosti u kliničko-hemijskim laboratorijama.

Važno je naglasiti da se rasvetljavanje molekulske osnove bolesti koju uzrokuju metali ne može postići kvantifikacijom metala u tečnim kliničkim uzorcima, poput seruma i/ili urina. Jedan od glavnih razloga je taj što koncentracija metala u serumu/urinu direktno zavisi od kvaliteta životnog okruženja i načina ishrane. Ovaj tip uzoraka može da pruži informacije o kratkotrajnom statusu metala u organizmu, kao i da ukaže na profesionalno izlaganje metalu na radnom mestu. Suprotno, analiza čvrstih tkiva keratinskog tipa (npr. dlake skalpa, noktiju) može da nam pruži informacije o dugotrajnoj izloženosti organizma metalima, ali se pouzdanost dobijenih podataka mora uzeti s rezervom zbog egzogene kontaminacije uzorka. Analiza metala u mekim ili čvrstim, nekeratinskim tkivima smatra se najpouzdanijim načinom za rasvetljavanje patogeneze ispitivane bolesti. Međutim, da bi se postavljeni cilj realizovao, neophodno je pristupiti invazivnom načinu sakupljanja uzoraka tkiva i obezbediti reprezentativni broj uzoraka adekvatne mase, što ujedno predstavlja i glavni ograničavajući faktor. Ako se krene od činjenice da se pouzdanost rezultata

može jedino prihvatiti u slučaju tačno i precizno određenih koncentracija metala i statističkog razdvajanja između ispitivanih grupa, situacija se dodatno komplikuje kada je potrebno sagledati metalomiku u zavisnosti od različitih kliničko-patoloških i drugih parametara (npr. pola, veličine i progresije tumora, konzumiranja duvana i drugih varijabli).

Tiroidna žlezda je histološki i funkcionalno kompleksni endokrini organ. Veoma dobra prokrvljenost i mogućnost nakupljanja metala čine tiroidno tkivo adekvatnim za praćenje efekata endokrine disrupcije. Pored toksičnih metala, povećana koncentracija esencijalnih metala takođe ima toksične efekte po tiroidno tkivo i nedvosmisleno se razmatra, prvenstveno u cilju praćenja promena u homeostatskoj regulaciji. Međutim, uzorci tiroidnih tkiva za analizu metala jedino se mogu obezbediti nakon hirurškog zahvata ili autopsije. Ovo je ujedno i glavni razlog za veoma mali broj istraživanja u kojima je metalomika reprezentativno sagledana na tkivnom nivou. S tim u vezi, utrošen je veliki napor (u trajanju od četiri godine) da se obezbede postoperativna tkiva tiroidne žlezde za potrebe ove studije.

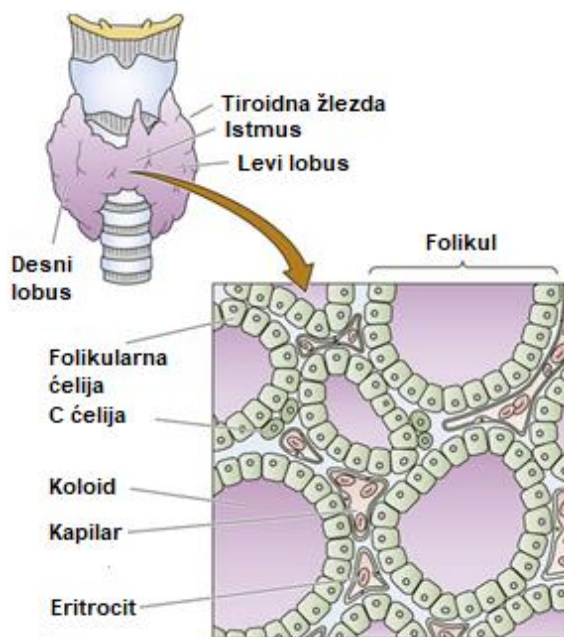
Metalomika tiroidnih oboljenja je slabo ispitana, dok je uloga metala u patogenezi bolesti tiroidee na tkivnom nivou nepoznata. S obzirom da je učestalost tiroidnih oboljenja u sve većem porastu kako u svetu tako i našoj zemlji, cilj ove studije bio je da se odredi sadržaj esencijalnih i toksičnih metala u zdravom tiroidnom tkivu i napravi komparativna analiza sa sadržajem metala u tkivima pacijenata s dijagnostikovanim benignim i malignim oboljenjima tiroidne žlezde. Dalji cilj studije bio je sagledavanje metalomike u skladu sa različitim biološkim i kliničko-patološkim parametrima, kao i pronalaženje najznačajnijeg metala (ili njegovog odnosa sa drugim metalom) koji može da razdvoji ispitivane grupe i pruži informacije o molekulskoj osnovi patofizioloških promena ispitivane bolesti tiroidne žlezde na tkivnom nivou.

2. OPŠTI DEO

2.1. Anatomska pozicija tiroidne žlezde i njena uloga

Tiroidna žlezda (*Glandula thyroidea*) je jedna od najvećih endokrinih žlezdi u ljudskom organizmu. Nalazi se na prednjoj strani vrata, odmah ispod grkljana i oko dušnika. Obrazovana je od dva lateralna lobusa (režnja), koja su međusobno povezana centralnim tkivnim suženjem – *istmusom* [1-6]. Tiroidna žlezda je obavijena fibroznom prevlakom (kapsulom). Oko 50% ljudi sa zdravom tiroidnom žlezdom sadrži treći (piramidalni) lobus, koji se proteže iznad istmusa (Slika 1) [7]. Normalna težina žlezde je između 15-20 g i njena masa se značajno uvećava u patološkim stanjima. Tiroidna žlezda je dobro vaskularizovana i pripada organima sa najvećom brzinom protoka krvi po gramu tkiva [2].

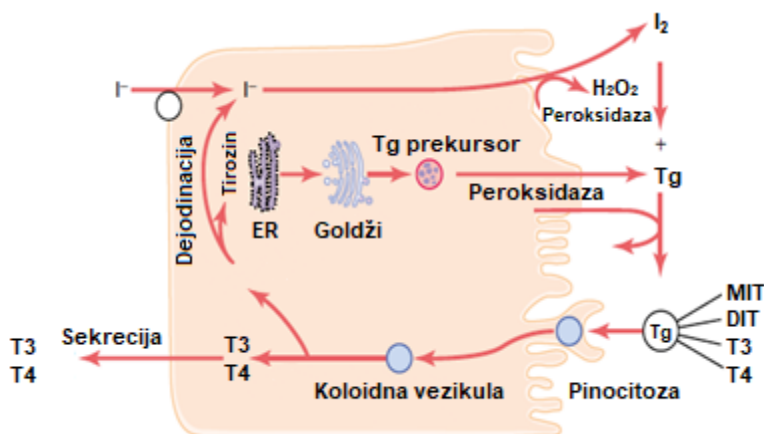
Sekretorne jedinice tiroidne žlezde nazivaju se tiroidni folikuli. Okruglasti oblik folikula i njihova aktivnost menja se u zavisnosti od izlučene količine tireostimulirajućeg hormona (TSH) iz adenohipofize. Folikuli su ispunjeni koloidom, tj. glikoproteinskom materijom obrazovanom od velike količine tireoglobulina (Tg) (Slika 1). Sinteza tiroidnih hormona odvija se u koloidu i na spoljašnjoj membrani folikularnih ćelija (tireocita). Tiroidna žlezda je jedini endokrini organ koji skladišti svoje sekretorne proizvode u velikim količinama (i do 100 dana) [2,5].



Slika 1. Anatomska pozicija i histološka građa tiroidne žlezde (modifikovano iz [5]).

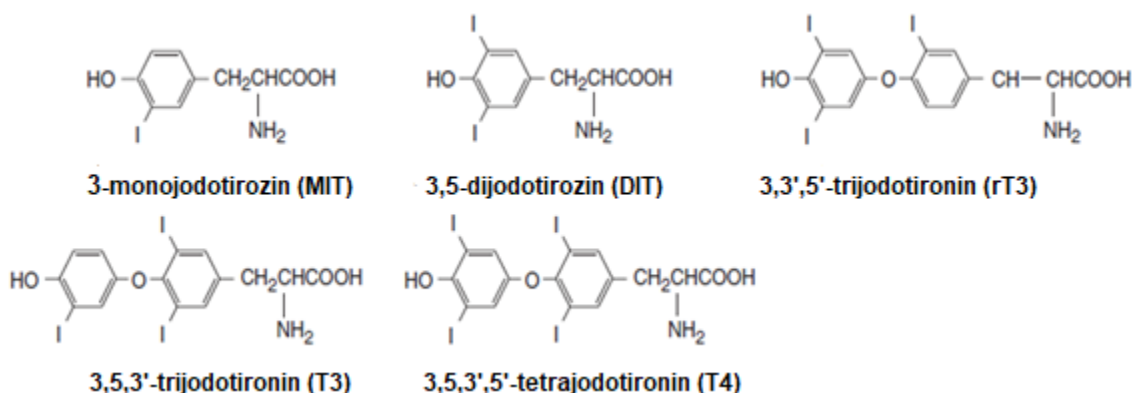
Pored folikularnih ćelija, tiroidna žlezda sadrži parafolikularne ili „C“ ćelije. One luče polipeptidni hormon kalcitonin, koji učestvuje u regulaciji koncentracije kalcijuma u krvi tako što inhibira osteoklaste u razgrađnji koštanog matriksa. Paratiroidni hormon (PTH) luče pretežno četiri paratiroidne žlezde, koje su lokalizovane na lobusima tiroidne žlezde. PTH ima suprotnu dejstvo od kalcitonina, tj. povećava koncentraciju kalcijuma i smanjuje koncentraciju fosfata u krvi [2,4,7].

Tiroidna žlezda luči dva glavna hormona: tiroksin (T4) i trijodotironin (T3). Prekursor za sintezu tiroidnih hormona je aromatična aminokiselina – tirozin. Ukupno 134 tirozinskih ostataka ulazi u sastav Tg-a (660 kDa), od kojih trećina učestvuje u reakcijama jodiranja. Kritičan korak u sintezi tiroidnih hormona je unos jodida u folikularne ćelije (pomoću Na^+/I^- simportera) i dalja oksidacija jodida do joda sa tiroidnom peroksidazom. U koloidu se odvijaju reakcije jodiranja tokom kojih se atomi joda dodaju tirozinu na Tg lanac. Dodavanjem jednog atoma joda jednom molekulu tirozina dobija se monojodotirozin (MIT), dok se dodavanjem dva atoma joda jednom molekulu tirozina dobija diiodotirozin (DIT). Trijodotirozin se dobija spajanjem jednog MIT-a sa jednim DIT-om, a tiroksin kombinovanjem dva DIT molekula. Tiroidni hormoni ostaju vezani za Tg lanac sve dok TSH ne podstakne pinocitozu Tg-a u folikularne ćelije. Lizozomalni enzimi u fagocitnoj vezikuli hidrolizuju peptidne veze između jodinovanih ostataka i Tg-a i na taj način otpuštaju T3 i T4 u citoplazmu ćelije, odakle se oni dalje oslobađaju u krvotok. Molekuli MIT-a i DIT-a ostaju unutar folikularne ćelije i podležu dejodinaciji do tirozina i jodida, koji se čuvaju za sintezu novih tiroidnih hormona (Slika 2). Približno 25% MIT-a i DIT-a daje tiroidne hormone [1-3,8]. Hemijske strukture tiroidnih hormona i njihovih prekursora prikazane su na Slici 3.



Slika 2. Sinteza tiroidnih hormona (modifikovano iz [1]).

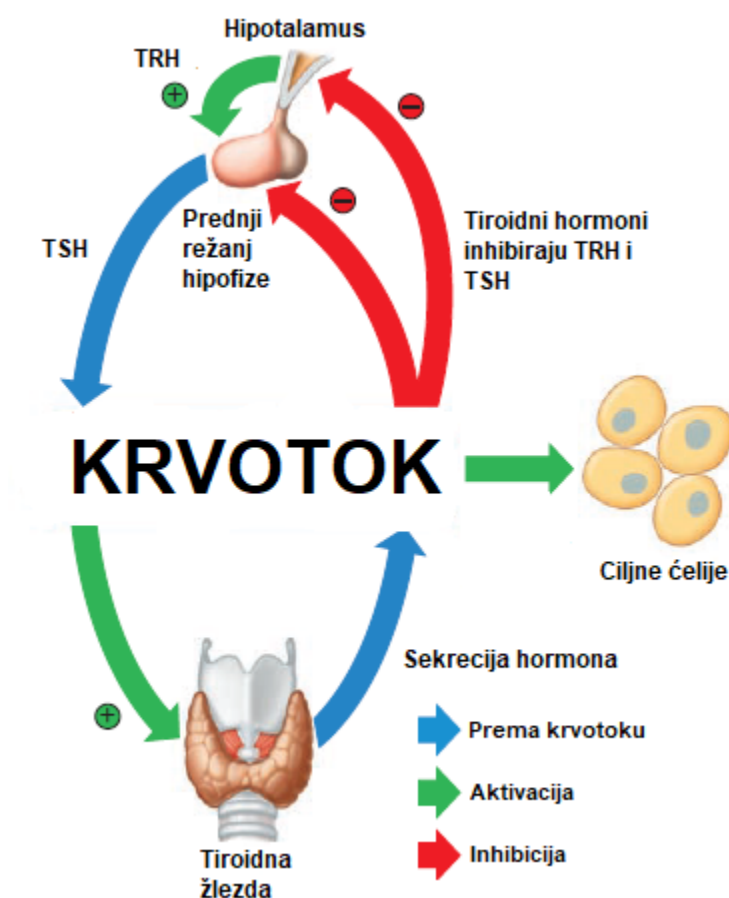
Tiroksin (T4) je hormon sa ograničenom biološkom aktivnošću. Oko 93% slobodnog T4 se izluči iz tiroidne žlezde i kasnije prevodi perifernom monodejodinacijom do aktivnijeg oblika (T3) u drugim organima, prvenstveno u jetri i bubrezima. Perifernom dejodinacijom spoljašnjeg prstena na 5' poziciji dobija se T3, dok se dejodinacijom na unutrašnjem prstenu dobija inaktivni, reverzni T3 (rT3). Slobodni tiroidni hormoni podležu konjugaciji do glukuronida u jetri, odakle se, preko žuči, odvođe u tanko crevo, gde dolazi do hidrolize konjugata, reapsorpcije jednog dela T3 i T4 i izbacivanja viška hormona fecesom. Na ova dva načina se održava ravnoteža tiroidnih hormona u organizmu. Stres, određene bolesti i lekovi mogu da pomere smer dejodinacije i da favorizuju formiranje rT3 u odnosu na T3. Količina izlučenog T3 iz žlezde nije veća od 7%. T3 ima veliki afinitet prema nuklearnim receptorima i pet puta je aktivniji od T4 [1,2]. Poluživot T4 u plazmi je oko 7 dana, dok je poluživot T3 svega jedan dan. Tiroidna žlezda dnevno izluči oko 80 µg T4 i oko 4 µg T3. Normalne vrednosti koncentracija T4 i T3 u plazmi su od 5 do 12 µg/dL (65-156 nmol/L) i od 0,08 do 0,22 µg/dL (1,2-3,3 nmol/L). Poluživot TSH iznosi oko 60 minuta. Normalna vrednost TSH u plazmi je oko 2 mU/L i nalazi se u opsegu 0,4-4,8 mU/L [3,5].



Slika 3. Hemijske strukture tiroidnih hormona i njihovih prekursora (modifikovano iz [3]).

Kako tiroidni hormoni nisu rastvorni u vodi, u organizmu se prenose u vezanom obliku za različite proteine. Svega 0,03% T4 i 0,3% T3 se u plazmi nalazi u slobodnom obliku i oni čine aktivnu frakciju koja ima supresivno dejstvo na TSH. Slobodni tiroidni hormoni nalaze se u ravnoteži sa vezanom frakcijom, što znači da unos hormona u različita tkiva proporcionalno zavisi od njihove koncentracije u krvotoku [2]. Antitiroidne supstance (npr. tiocijanat, povećan nivo jodida, propiltiouracil itd.) imaju supresivan efekat na lučenje tiroidnih hormona [1].

Sinteza i izlučivanje tiroidnih hormona regulisana je autoregulacijom i neuroendokrinom regulacijom. Brzina unosa jodida u folikularne ćelije, oksidacija i vezivanje joda za Tg molekul zavise od dostupne količine jodida u organizmu. Unos jodida u ćelije povećava se ako je sadržaj u organizmu smanjen i obrnuto. Neuroendokrina regulacija odvija se na nivou hipotalamusa i adenohipofize. Neurosekretorne ćelije hipotalamusa luče tireotropni oslobađajući-hormon (TRH) koji, preko portalnog sistema hipofize, stimuliše adenohipofizu da luči TSH. Neuroendokrina regulacija se odvija po principu negativne povratne sprege, što znači da povećana koncentracija T4 u krvi deluje supresivno na funkciju adenohipofize i obrnuto (Slika 4) [1-3,6].



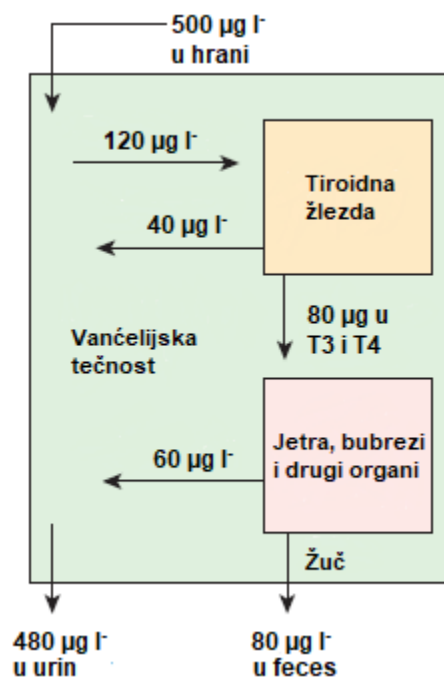
Slika 4. Neuroendokrina regulacija tiroidnih hormona (modifikovano iz [4]).

Tiroidni hormoni imaju brojne funkcije u organizmu. Oni utiču na kalorigenezu, brzinu bazalnog i mitohondrijalnog metabolizma, pravilan razvoj nervnog i skeletnog sistema, stimulišu adrenergičku aktivnost (povećavajući brzinu srčanih kontrakcija), modulišu metabolizam lipida (holesterola i triacilglicerola), obezbeđuju seksualno sazrevanje itd. [2,5].

2.2. Jod i jodna profilaksa u Srbiji

Jod je esencijalni mikroelement za sintezu tiroidnih hormona. Tiroksin sadrži 65% joda, dok T3 sadrži 59% joda po masi [9]. Od ukupne količine joda u organizmu (10-20 mg), između 70 i 80% se nalazi u tiroidnoj žlezdi [10,11]. Primarni izvori joda su hrana i pijaća voda. Jod se u organizmu redukuje do jodida i apsorbuje u duodenumu i ileumu, nakon čega se jodidi vezuju za proteine plazme (svega 0,5% jodida čini slobodnu, neproteinski-vezanu frakciju) [12]. Ukupna koncentracija jodida u serumu/plazmi direktno zavisi od dnevnog unosa i nalazi se u intervalu od 40 do 80 µg/L [13].

Količina jodida koju tiroidna žlezda preuzima iz krvi je uravnotežena, što znači da nivo jodida u plazmi opada kada tiroidni klirens raste. *Tiroidni klirens joda* može da se poveća do 100 mL/min u stanjima deficijencije joda ili da opadne na 3-4 mL/min kada je hronični dnevni unos joda veći od 500 µg (Slika 5). Preporučeni dnevni unos za odrasle osobe je 150 µg. Trudnicama i dojiljama su potrebne nešto veće količine (oko 200 µg dnevno) [14]. S obzirom da se više od 90% jodida izluči urinom, najpouzdaniji klinički uzorak za praćenje dnevnog unosa i deficita joda je 24-časovni uzorak urina. Dnevni unos joda od 150 do 300 µg odgovara koncentraciji u urinu od 100 do 200 µg/L [15,16].



Slika 5. Metabolizam jodida sa polaznim dnevnim unosom od 500 µg (modifikovano iz [5]).

Deficit joda u organizmu javlja se ako je dugoročan dnevni unos mikroelementa manji od 50 µg. *Bolesti uzrokovane nedostatkom joda* predstavljaju ozbiljan zdravstveni problem širom sveta. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO), približno dve milijarde ljudi je ugroženo da razvije neku od bolesti uzrokovane nedostatkom joda [17-19]. Najrizičnija grupa su trudnice i najteže oboljenje, *hipotiroidni kretinizam*, javlja se kada placentalni krvotok majke ne snabdeva plod adekvatnim zalihama joda [2].

Dobar dijagnostički i epidemiološki marker za praćenje bolesti uzrokovane nedostatkom joda podrazumeva kvantifikaciju jodida u 24-časovnom uzorku urina i dalju evaluaciju rezultata prema sledećim smernicama: ozbiljna stanja (< 20 µg/L), rizična (20-49 µg/L), umerena (50-99 µg/L) i bez znakova deficijencije (100-199 µg/L) [20].

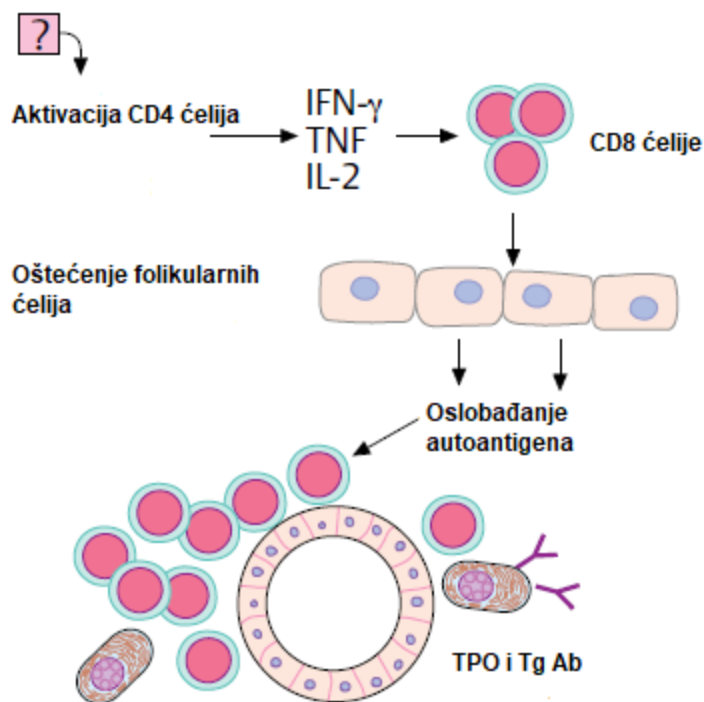
Jodna profilaksa u Srbiji (Jugoslaviji) prvi put je započeta 1951. godine dodavanjem 5 mg kalijum-jodida na kilogram kuhinjske soli, u cilju suzbijanja pojave gušavosti i eradikacije hipotiroidnog kretinizma. Godinama se količina kalijum-jodida povećavala, da bi danas iznosila oko 20 mg KI na kilogram NaCl-a. Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ iz 2007. godine, vrednosti medijane jodida u urinu ispitivanih trudnica bile su blizu donje granice preporučenih vrednosti za nivoe jodida u urinu, dok je jodni nutritivni status trudnica koje nisu koristile suplemente takođe bio ispod granice za preporučene vrednosti. Jedino je nutritivni status joda ispitivane dece (uzrasta od 6 do 14 godina) bio optimalan [21,22]. Važno je naglasiti da u Srbiji nije nastavljeno praćenje nivoa jodida u urinu na nacionalnom nivou, kao i da nije izvršena eventualna korekcija propisanog načina jodiranja kuhinjske soli u skladu sa međunarodnim smernicama još od 1993. godine [14].

2.3. Nodularna prezentacija i tiroidna disfunkcija

Difuzno ili nodularno uvećanje tiroidne žlezde naziva se *gušavost (struma)*. Deficit joda predstavlja glavni etiološki faktor rizika za pojavu gušavosti. U krajevima sa deficijencijom joda ovo stanje je poznato kao *endemska gušavost* i u pojedinim slučajevima tiroidna žlezda može biti uvećana do 20 puta [1,23,24]. Uvećanje žlezde koje prati prisustvo jednog nodusa (čvora) naziva se *nodularna struma*. Kada je u tiroidnoj žlezdi prisutno dva ili više nodusa, tada se govori o *multinodularnoj strumi* [25]. Nodularne i multinodularne strume su u najvećem broju slučajeva izazvane akumulacijom koloida i nazivaju se *koloidne strume*. Deficijencija joda ne smatra se etiološkim faktorom rizika za razvoj nodusa u tiroidnoj žlezdi [1,26,27].

Tiroidni čvorovi su diskretna uvećanja mase tiroidnog tkiva bez palpabilnih nepravilnosti na drugim anatomskim lokacijama. Iako je najveći broj čvorova benigne prirode (adenomi, ciste, solitarni čvorovi kod 10% pacijenata sa Hašimotovim tiroiditisom itd.), oko 5% čvorova može da sadrži maligno-izmenjene ćelije [28-32].

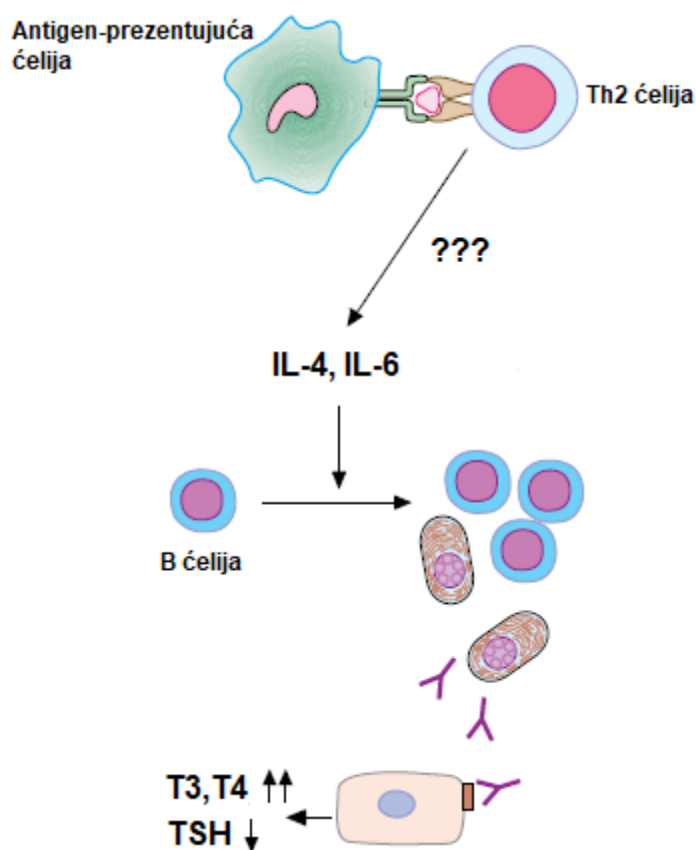
Hipotiroidizam i hipertiroidizam su dva najčešća oblika tiroidne disfunkcije. Oba klinička stanja su učestalija kod žena i njihova incidencija raste sa starenjem [32-36]. Hipotiroidizam se javlja usled nedovoljnog lučenja tiroidnih hormona i njegova učestalost u opštoj populaciji kreće se do 15% [2]. *Hašimotov tiroiditis (HT)* je glavni uzročnik autoimuskog hipotiroidizma u razvijenim zemljama, u kojima je dnevni unos joda adekvatan. Mehanizam nastanka HT-a vezuje se za T_H1 tip T ćelija, koje oslobađanjem $TNF\alpha$, IL-2 i $IFN-\gamma$ stimulišu $CD8^+$ T ćelije da vrše razaranje tiroidnog tkiva, što za posledicu ima oslobađanje antigena i sekundarnu proizvodnju TPO- i Tg-specifičnih autoantitela (Slika 6). Pacijenti sa HT-om razvijaju kliničke simptome hipotiroidizma tek nakon uznapredovale destrukcije tiroidnih folikula [37].



Slika 6. Autoimunski mehanizam nastanka Hašimotovog tiroiditisa (modifikovano iz [37]).

Hipertiroidizam ili tireotoksikoza se javlja usled prekomerne sinteze tiroidnih hormona. U odnosu na hipotiroidizam, učestalost hipertiroidizma je dosta manja u opštoj populaciji (oko 0,5%) [37-40]. *Grejvs-Bazedovljeva bolest* je u 60-80% slučajeva glavni uzročnik autoimuskog

hipertiroidizma i odlikuje se difuznim uvećanjem žlezde. Kod najvećeg broja obolelih javlja se jednostrani ili obostrani egzoftalmus – izbočenje očnih jabučica [40-42]. Mehanizam nastanka oboljenja vezuje se za razvoj stimulativnih autoantitela na TSH receptore u folikularnim ćelijama koje kontinuirano podstiču povećanu sintezu T4 i T3. Kao odgovor na povećano lučenje tiroidnih hormona, dolazi do supresivnog otpuštanja TSH iz adenohipofize. Autoimunski odgovor na TSH receptor najverovatnije je uzrokovan virusnim antigenom koji nosi veoma visok stepen sličnosti sa TSH receptorom. T_H2 tip T ćelija podstiču diferencijaciju plazma (B) ćelija i dalje formiranje autoantitela preko IL-4 i IL-6 (Slika 7) [37].



Slika 7. Autoimunski mehanizam nastanka Grejvs-Bazedovljeve bolesti (modifikovano iz [37]).

2.4. Benigni tumor

Tiroidni adenom je nodularna bolest lokalizovana unutar tiroidne kapsule, koju čine koloidni, folikularni, Hirtlovi, atipični, fetalni i hijalinizirajući trabekularni benigni tipovi [43]. Toksični adenomi predstavljaju jedan od glavnih uzročnika neautoimnskog hipertireoidizma.

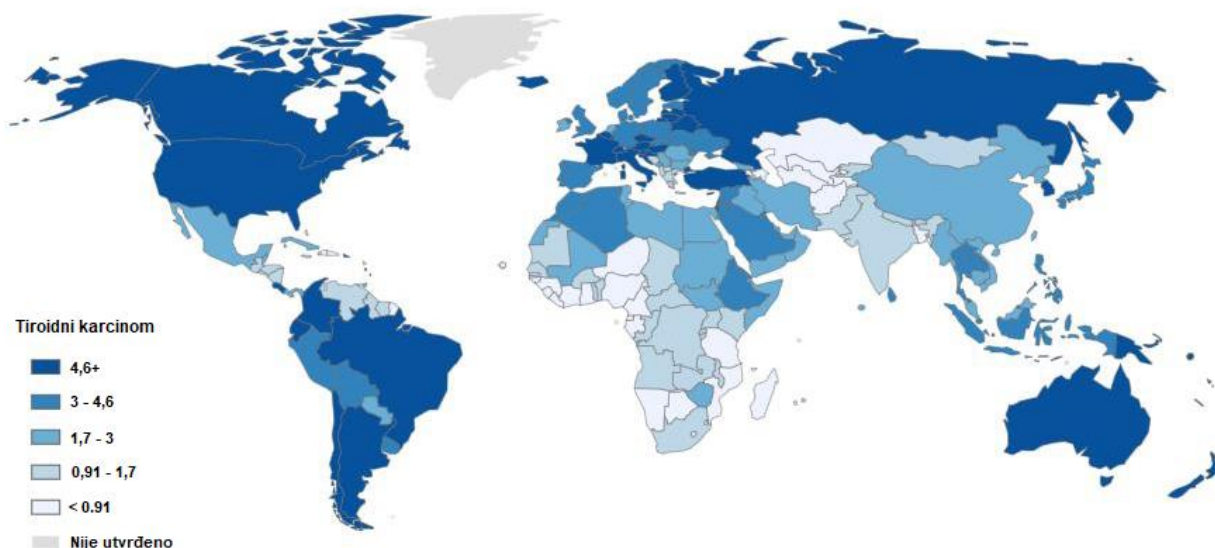
Interesantan efekat toksičnog adenoma je u tome da sekretorni deo žlezde koji nije zahvaćen tumorom ostaje potpuno inhibiran usled supresivnog dejstva povećane koncentracije T3 i T4 na TSH [1]. Tiroidni adenomi su prisutni kod 4% odraslog stanovništva, a od navedenih tipova su najčešći koloidni i folikularni tipovi. Kada se citološkim analizom utvrdi da je lezija benigna, terapija izbora je tiroidna lobektomija (hirurško uklanjanje lobusa na kojem se nalazi tumor) u slučaju da veličina promene ne izaziva kompresivne smetnje. Adenomi se najčešće otkriju tek na autopsiji [44].

2.5. Maligni tumori tiroidne žlezde

Kancer je kompleksna, jedinstvena i druga po učestalosti bolest u svetu. Registrovan broj slučajeva u 2000. godini iznosio je 10 miliona, a predikcijskom analizom je utvrđeno da će broj novoobolelih slučajeva u 2020. godini iznositi oko 15 miliona [45,46]. Kancerogeneza obuhvata tri faze: inicijaciju (oštećenje ćelija praćeno izlaganjem lokalnog tkiva kancerogenu), promociju (stimulisanje rasta prethodno izmenjenih ćelija) i progresiju (autonomni rast tumora). Konačan rezultat kancerogeneze je invazija i širenje malignih ćelija van primarnog tkiva koji je zahvatio tumor (metastaza). Uloga metala u kancerogenezi je kompleksna i metali svoj kancerogeni efekat najverovatnije ispoljavaju u prvoj fazi [47-50]. Razumevanje mehanizma nastanka kancera u *in vivo* uslovima i samim tim patogeneze bolesti dodatno otežavaju sinergističke i/ili antagonističke interakcije koje se javljaju između esencijalnih i toksičnih metala [51].

Tiroidni karcinomi čine manje od 1% svih humanih tumora. Međutim, tiroidni karcinomi su najčešći maligni tumori endokrinog sistema organa [52,53]. Učestalost tiroidnih karcinoma značajno se povećala u gotovo svim državama u poslednjih tridesetak godina [54]. U Saudijskoj Arabiji je tiroidni karcinom drugi po učestalosti malignitet kod žena [55], dok je u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) tiroidni karcinom tumor s najbržim rastom novoobolelih slučajeva [56,57]. Izuzetak su Norveška, Švedska, Holandija i veliki broj država afričkog kontinenta, gde je incidencija u padu (Slika 8) [58]. Tiroidni karcinomi se od dva do četiri puta češće javlja kod žena [54]. Ferlay i sar. [59] istakli su da tiroidni karcinomi zauzimaju 24. mesto u Srbiji po učestalosti. Slijepčević i sar. [60] zabeležili su da je učestalost tiroidnih karcinoma u Srbiji za period od 1999. - 2008. iznosila 3 na 100.000 žena i 1 na 100.000 muškaraca. Najveća učestalost zabeležena je kod žena između 20 i 29 godina i kod muškaraca između 30 i 39 godina. Autori su,

takođe, istakli da se u Srbiji u narednom periodu može očekivati porast novoobolelih slučajeva od tiroidnih karcinoma.



Slika 8. Učestalost tiroidnih karcinoma u svetu (modifikovano iz [59]).

Tačan uzročnik tiroidnog karcinoma nije poznat, a u glavne (egzogene) etiološke faktore spada izlaganje jonizujućem zračenju, deficitaran unos joda, distribucija radioaktivnog joda u tiroidnom tkivu i izlaganje nerastvornim kancerogenima [61] (Tabela 1). Tiroidna žlezda je veoma osetljiva na zračenje i najbolji primer je havarija nuklearnog reaktora u Černobilju 1986. godine, kada je oslobođeno $1,7 \times 10^{18}$ Bq ^{131}I u atmosferu. Već godinu dana nakon černobiljske nesreće zabeležen je porast broja obolelih od tiroidnih i drugih karcinoma (leukemije, tumora dojke itd.) u svim uzrasnim kategorijama, posebno kod dece i u prečniku od 100 kilometara od elektrane [61]. Deficit joda dovodi do nedovoljnog lučenje tiroidnih hormona, povećane sinteze TSH i uvećanja tiroidne žlezde. Primer je veća učestalost oboljevanja u planinskim u odnosu na primorske krajeve [62]. Distribucija radioaktivnog joda (^{131}I) u organizmu odvija se na isti način kao i distribucija prirodnog joda (^{127}I), što znači da se najvećim delom ugrađuje u tiroidnu žlezdu gde učestvuje u jonizaciji tkiva i izaziva nekrozu folikularnih ćelija, formiranje pseudolobulusa, malignu izmenu ćelija i proliferaciju. Jedina moguća zaštita stanovništva od radioaktivnog joda podrazumeva pravovremeno zasićenje tiroidne žlezde sa kalijum-jodidom. Za razliku od Poljske i nekih drugih zemalja, bitno je naglasiti da u Srbiji nikada nije sprovedena jodna profilaksa na nacionalnom nivou nakon havarije u černobiljskom nuklearnom reaktoru [14]. Pored navedenih

etioloških faktora, pojava tiroidnih karcinoma vezuje se za prekomeran unos nitrata, koji ometaju unos jodida u folikularne ćelije preko Na^+/I^- simportera [58].

Tabela 1. Glavni egzogeni faktori rizika za razvoj tiroidnih karcinoma.

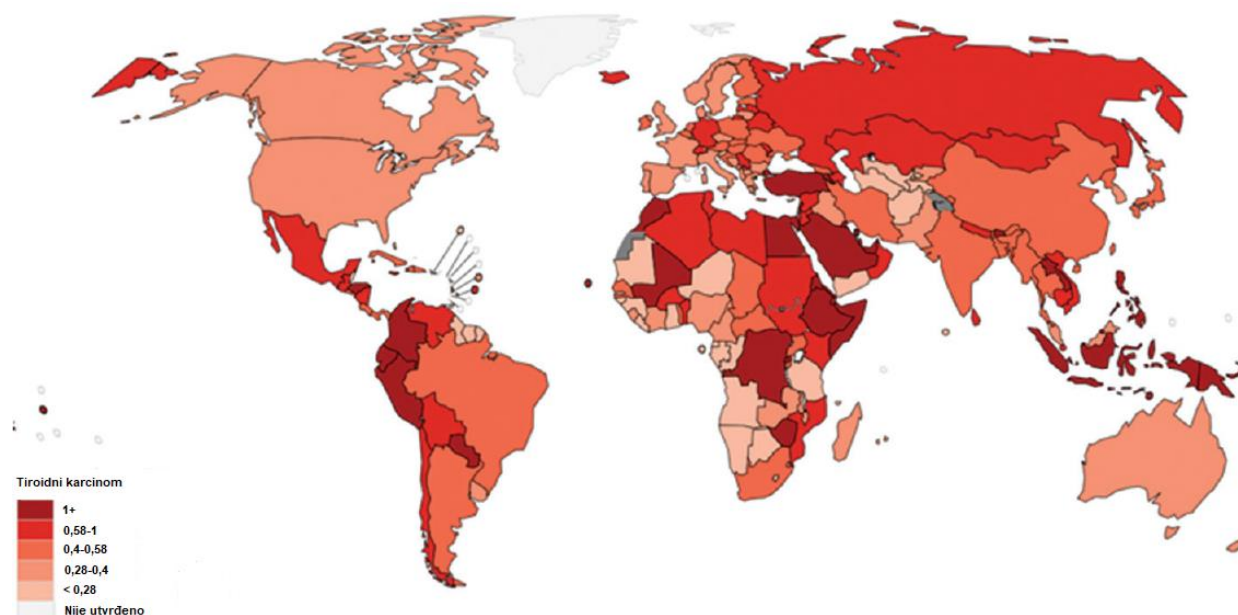
Faktor	Izvor
X-zračenje	Dentalni snimak, CT sken, Rendgenografija
^{131}I	Nuklearne katastrofe ili dijagnostičke nuklearne metode u medicini
Jod	Ishrana, jodna profilaksa, BRAF mutacija
Nitrati	Voda ili hrana
Zagađivači (metali, pesticidi...)	Nerastvorni karcinogeni

Preoperativna dijagnostika je od presudnog značaja za isključivanje prisustva karcinoma štitaste žlezde, kao i za razlikovanje malignog tumora od benignog. Pored ehotomografske i ultrazvučne karakterizacije nodusa, najvažnija dijagnostička procedura je *aspiraciona biopsija*. Ova procedura se zasniva na izvlačenju tiroidnog tkiva iz sumnjivog nodusa pomoću tanke igle i daljoj citološkoj analizi aspirata. U pitanju je brza, jeftina i minimalno invazivna procedura koja je značajno smanjila broj pacijenata koji se šalje na dodatnu preoperativnu dijagnostiku u koju spadaju metode nuklearne medicine i radiologije. S obzirom da oko 50% starije populacije ima jedan ili više nodusa u tiroidnoj žlezdi, a da je maligno manje od 5%, hirurško odstranjivanje novootkrivenih čvorova nije poželjno kako sa medicinskog tako ni sa ekonomskom stanovišta [63]. Prema “Bethesda staging” klasifikaciji nalaza dobijenog aspiracionom biopsijom mogu se obezbediti značajne informacije koje ukazuju da li se radi o benignom, malignom, suspektom ili neinformativnom nalazu [64]. Kod 20% slučajeva se procedura ne izvede uspešno, a kod 30% slučajeva se tačna dijagnoza ne može postaviti. Drugo i veliko ograničenje aspiracione biopsije je nemogućnost razlikovanja folikularnog karcinoma od folikularnog adenoma [65]. U odnosu na preoperativnu dijagnostiku, patohistološki (PH) pregled postoperativno dobijenog tkiva tiroidee predstavlja „zlatni standard“ u postavljanju definitivne dijagnoze tiroidnih oboljenja, ali treba uzeti u obzir da je izvodljiv samo kod pacijenata koji se upućuju na hirurško lečenje [44,64].

Ohrabrujuća informacija je da mortalitet od tiroidnih karcinoma ne raste brzinom njegove učestalosti, dok je u nekim zemljama čak u padu (Slika 9).

Maligni tumori tiroidne žlezde mogu se razvijati iz folikularnih, „C“ ćelija ili onkocitnih ćelija. Papilarni, folikularni i anaplastični karcinom tiroidne žlezde vode poreklo od folikularnih ćelija, medularni karcinom vodi poreklo od parafolikularnih ili „C“ ćelija, dok Hirtlov karcinom

vodi poreklo od onkocitnih ćelija. Papilarni i folikularni karcinomi tiroidne žlezde čine više od 90% dobro diferenciranih karcinoma, dok anaplastični karcinom čini manje od 2% svih tiroidnih karcinoma [66-70].



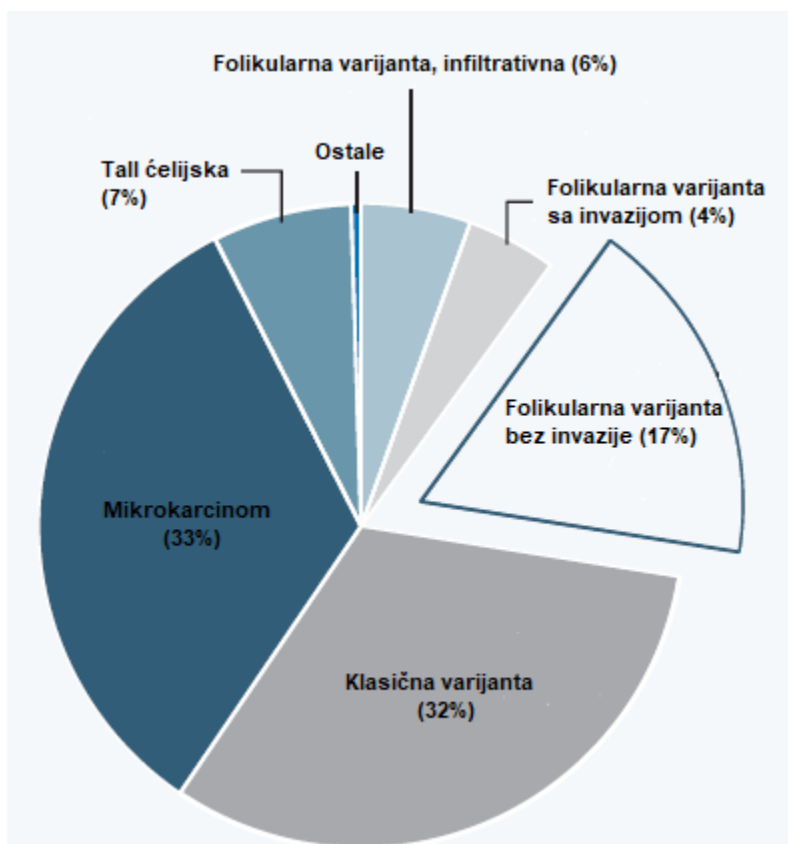
Slika 9. Mortalitet uzrokovan tiroidnim karcinomom u svetu (modifikovano iz [59]).

2.5.1. Papilarni karcinom

Papilarni karcinom čini oko 80% svih malignih tumora tiroidne žlezde [71,72]. Najčešće se javlja između 30. i 50. godine života, dosta ređe kod mlađe populacije kada je i najagresivniji. U glavne faktore koji dovode do razvoja papilarnog karcinoma izdvaja se jonizujuće zračenje, deficit joda i autoimunski Hašimotov tiroiditis [73,74]. Pored navedenih etioloških faktora, noviji literaturni podaci ukazuju na porast oboljevanja od papilarnog karcinoma tiroidne žlezde kod ljudi koji žive u vulkanskim krajevima Islanda, Havaja i Sicilije. Najbolji primer je dvostruko veća učestalost papilarnog karcinoma u području Etne u odnosu na ostatak Sicilije, što se vezuje za neantropogenu izloženost stanovništva teškim metalima i karakterističnu mutaciju BRAF gena [58].

Zabeleženo je više od deset patohistoloških varijanti papilarnog karcinoma [64] (Slika 10). Jedna od najznačajnijih karakteristika papilarnog karcinoma je *intratiroidna multicentrična diseminacija*, odnosno pojava većeg broja manjih tumora koji se mogu naći na istom ili na kontralateralnom lobusu tiroidne žlezde u odnosu na lokalizaciju primarnog tumora. Učestalost

multicentričnosti kreće se od 18 do 46% [74]. Kod pacijenata sa retrosternalnim rastom tiroidne žlezde (iza grudne kosti) veća je učestalost oboljevanja od papilarnog karcinoma [70]. TNM klasifikacija papilarnog karcinoma tiroidne žlezde koja se koristi u kliničkom i istraživačkom radu data je u Tabeli 2.



Slika 10. Patohistološke varijante papilarnog karcinoma tiroidne žlezde (modifikovano iz [69]).

Tabela 2. TNM klasifikacija papilarnog karcinoma tiroidne žlezde [70].

Oznaka	
T1	Primarni tumor ≤ 2 cm
T2	2 cm < primarni tumor ≤ 4 cm
T3	Primarni tumor > 4 cm, ograničen na žlezdu, sa minimalnim ekstratiroidnim širenjem
T4	Probijanje kapsule i širenje tumora na okolne strukture vrata
Tx	Nepoznata veličina primarnog tumora, bez ekstratiroidnog širenja
No	Bez metastatskih čvorova
N1	Metastaze prisutne u regionalnim limfnim čvorovima
N2	Metastaze prisutne u udaljenijim limfnim čvorovima

Nx	Depoziti u limfnim čvorovima ne mogu da se procene
Mo	Bez udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze su prisutne
Mx	Udaljene metastaze ne mogu da se procene

S obzirom da dijagnostički tumorski marker za papilarni karcinom ne postoji, određivanje tireoglobulina u serumu dobija na značaju tek kada se načini potpuno uklanjanje tiroidne žlezde kod pacijenata sa dobrodiferenciranim tumorom [66]. Papilarni karcinom pokazuje sklonost ka lokoregionalnom metastaziranju u limfne čvorove vrata, dok odmakle stadijume bolesti prati i prisustvo sekundarnih depozita u drugim organima (jetri, plućima, kostima), što značajno utiče na povećanje 20-godišnjeg mortaliteta [70].

Papilarni karcinom raste sporo i samim tim ima veoma dobru prognozu. Desetogodišnje preživljavanje je oko 96% i gotovo je jednako 20-godišnjem preživljavanju (95%) [74]. Leči se pogodnom hirurškom resekcijom (lobektomijom ili tireoidektomijom sa ili bez uklanjanja limfnih čvorova u predelu vrata). Postoperativno se može primeniti terapija radioaktivnim jodom za uklanjanje preostalog dela tiroidnog tkiva i redukovanje mikrometastaza. Nakon ablacione terapije sa radioaktivnim jodom, određivanje Tg-a u krvi dobija na dijagnostičkom značaju [72, 73].

2.5.2. Folikularni karcinom

Folikularni karcinom takođe spada u dobrodiferencirane maligne tumore tiroidne žlezde. Učestalost folikularnog karcinoma je između 10 i 15% u odnosu na ostale maligne tumore. Nije zabeležena nasledna forma bolesti. Češće se javlja u područjima sa deficitom joda i kod starijih ljudi. Prognoza folikularnog karcinoma zavisi od stepena zahvaćenosti tiroidne kapsule i krvnih sudova [66,75]. Folikularni karcinom tiroidne žlezde deli se na minimalno invazivni i široko invazivni histološki tip. Široko invazivni tiroidni karcinom zahteva agresivno lečenje, jer je zabeleženi mortalitet oko 50% u odnosu na minimalno invazivni tiroidni karcinom kod koga je mortalitet oko 3% [68].

Folikularni karcinom se prvenstveno širi putem krvotoka, ređe limfotokom, što je glavna razlika u odnosu na papilarni karcinom. Udaljene metastaze se javljaju kod 20% slučajeva [44]. Leči se na isti način kao i papilarni karcinom [69].

Hurthle-ov ili karcinom onkocitnih ćelija je poseban tip folikularnog karcinoma i čini oko 3% ukupnih karcinoma tiroidne žlezde. Predstavlja nešto agresivniju formu koja, za razliku od folikularnog karcinoma, češće daje limfogene metastaze, a maligno-izmenjene ćelije ne mogu da vezuju jod, tako da terapija radiojodom nije efikasna i njegova prognoza je nešto nepovoljnija u odnosu na folikularni karcinom [68].

2.5.3. Anaplastični karcinom

Anaplastični karcinom je najopasniji i najagresivniji tip malignih tumora tiroidne žlezde. Učestalost anaplastičnog karcinoma nije velika u odnosu na druge maligne tumore (< 2%). Za ovaj tip karcinoma su karakteristične dediferencirane folikularne ćelije, koje poseduju pojačanu mitotsku aktivnost i nemogućnost da koncentruju jod u tkivu (usled gubitka ekspresije Na^+/I^- simportera), što za posledicu ima nemogućnost sinteze Tg-a. Najčešće se javlja u krajevima sa endemskom gušavošću i kod ljudi sa nedijagnostikovanim karcinomom tiroidee između 60-70 godine života. Dijagnoza se najčešće postavi kasno, kada tumor obuhvati larinks, farinks i druge anatomske delove vrata. Anaplastični karcinom ima u gotovo 100% slučajeva fatalan ishod i polovina pacijenata ne preživi duže od šest meseci nakon postavljanja dijagnoze. Preživljavanje pacijenata se može poboljšati hemioterapijom i transkutanom zračnom terapijom [70,76].

2.5.4. Medularni karcinom

Za razliku od karcinoma koji vode poreklo od folikularnih ćelija, medularni karcinom se razvija iz parafolikularnih ili „C“ ćelija [77-80]. Ove ćelije su lokalizovane na gornjim delovima lobusa, pa se i tumori najčešće razvijaju na tim anatomske mestima [81]. Medularni karcinom se javlja u oko 5% slučajeva i učestaliji je u petoj i šestoj deceniji života. Najčešće je sporadičan (75%), dok se u preostalom procentu nasleđuje autozomno-dominantno. Karakteristična mutacija RET protoonkogena na hromozomu 10 odgovorna je za nasledni oblik medularnog karcinoma [77]. Za razliku od ostalih karcinoma tiroidne žlezde, za medularni karcinom su karakteristične povećane vrednosti koncentracija kalcitonina u krvi. Kalcitonin je pouzdan tumorski marker i njegove normalne vrednosti u krvi gotovo sigurno mogu da isključe prisustvo medularnog karcinoma, osim u izuzetnim slučajevima. U odnosu na druge tipove tiroidnih karcinoma, ovaj tip češće daje udaljene metastaze u kostima, jetri i plućima. Hirurško lečenje je jedino efikasno. Procenat petogodišnjeg preživljavanja je 75%, nakon adekvatno sprovedenog lečenja [77-80].

2.6. Klinički značaj metalomike

Izraz „metalomika“ prvi put je upotrebljen 2001. godine od strane Williams-a. U pitanju je moćno i obećavajuće polje istraživanja, koje se zasniva na kvantifikaciji metala od interesa u biološkim sistemima i daljoj karakterizaciji metala (distribuciji, specijaciji, metabolizmu itd.). Kako metali čine sastavni deo velikog broja proteina/enzima, metalomika je usko povezana sa metaloproteomikom. Zbog primarne ili sekundarne uloge metala u patogenezi različitih bolesti, metalomika svoju primenu nalazi u medicini, toksikologiji i biohemiji [82].

Veliki broj studija u poslednjih nekoliko decenija ukazao je da koncentracija metala može da bude izmenjena u različitim patološkim stanjima. Međutim, rasvetljavanje molekulske osnove bolesti humanih tkiva i organa koju uzrokuju metali ne može se postići određivanjem metala u tečnim kliničkim uzorcima, poput seruma/plazme i/ili urina. Jedan od glavnih razloga je taj što koncentracija metala u serumu/urinu direktno zavisi od načina ishrane. Ovaj tip uzoraka može da nam pruži pouzdane informacije o kratkotrajnom statusu metala u organizmu i svoj značaj nalazi u dijagnostici akutnih ili profesionalnih bolesti, u situacijama slučajnog ili namernog ispuštanja toksičnih metala u životnu sredinu [83-86], kao i u praćenju toksičnih efekata metala koji se oslobađaju iz koštanih implanata (npr. Co i Cr) [87]. Određivanjem metala u punoj krvi proširuju se informacije o njihovom statusu za period od 120 dana [88]. Za pouzdano tumačenje rezultata neophodno je utvrditi referentne intervale za esencijalne i toksične metale u ispitivanoj populaciji [89,90]. Suprotno, analiza čvrstih tkiva keratinskog tipa (dlake skalpa, noktiju) pruža informacije o dugotrajnoj izloženosti organizma metalima, ali se pouzdanost dobijenih rezultata mora uzeti s rezervom zbog egzogene kontaminacije uzorka (npr. farbana ili na bilo koji način tretirana kosa) i nemogućnosti optimizacije koraka u preanalitičkoj fazi rada [88]. Analiza metala u mekim ili čvrstim, nekeratinskim tkivima smatra se najpouzdanijim načinom za rasvetljavanje patogeneze ispitivane bolesti. Međutim, da bi se ovaj cilj realizovao, neophodno je pristupiti invazivnom načinu sakupljanja reprezentativnog broja tkiva adekvantne mase, što ujedno predstavlja i glavni ograničavajući faktor.

Da bi metalomika imala značaj u kliničkoj hemiji i kliničkim istraživanjima, neophodno je raspolagati sa najsofisticiranijim analitičkim tehnikama za pripremu i kvantifikaciju metala u kliničkim uzorcima.

2.6.1. Priprema kliničkih uzoraka

Priprema uzorka za analizu metala je kritičan korak preanalitičke faze i predstavlja glavni uzrok kontaminacije. Ovo se prvenstveno odnosi na metale koji se u kliničkim uzorcima nalaze u ultra-tragovima. Mala polazna masa, kompleksni sastav i potencijalna infektivnost čine da rad sa kliničkim uzorcima bude izazovniji u odnosu na druge realne uzorke [91].

Klinički uzorci čvrstih tkiva pripremaju se metodama razaranja (digestije), dok se klinički uzorci tečnog tkiva razblažuju sa pogodnim sistemom rastvarača. Kombinacija koncentrovane azotne kiseline i vodonik-peroksida pokazala se najefikasnijim sistemom rastvarača za razaranje kliničkog materijala. Azotna kiselina formira rastvorne nitrata sa većinom elemenata periodnog sistema, osim sa zlatom i platinom (ne oksiduje ih) kao i sa aluminijumom, borom, hromom i titanijumom (pasivizira ih). Upotreba drugih kiselina, poput hlorovodonične ili sumporne, se izbegava zbog formiranja teško rastvornih soli metala (npr. srebro(I)-hlorida ili barijum-sulfata). Razaranje organskog matriksa sa azotnom kiselinom odvija se prema jednačini: $(CH_2)_x + HNO_3 \rightarrow CO_{2(g)} + NO_{x(g)} + H_2O$. Cilj metoda razaranja je kompletno uništavanje organskog matriksa, oslobađanje metala u rastvor i dobijanje bistrog, tečnog uzorka za analizu. Vodonik-peroksid se dodaje da ubrza proces razaranja i spreči ponovnu oksidaciju NO_x do nitrata, čime se smanjuje nastali broj žutih oksida azota [92,93].

Metoda suvog spaljivanja i razaranja u otvorenim sistemima se generalno izbegava u radu sa kliničkim uzorcima zbog kontaminacije i potencijalnih gubitaka lako isparljivih analita koji su od interesa. Razaranje u zatvorenim sistemima značajno umanjuje gubitak elemenata iz rastvora i rizik od kontaminacije. Osim toga, sa povećanjem pritiska povećava se temperatura ključanja kiseline čime se pojačava njeno oksidaciono dejstvo [92,93].

Jedna od najkorišćenijih metoda za pripremu kliničkih uzoraka je *mikrotalasna digestija*. Metoda se zasniva na dipolarnoj rotaciji molekula i kondukciji. Kako polarni molekuli teže da izjednače svoj dipolni moment sa mikrotalasnim elektromagnetnim (EM) poljem, sa promenom EM polja menja se rotacija molekula, što dovodi do sudara sa okolnim molekulima u rastvoru. Promene električnog polja ne utiču na nepolarne ili slabo polarne molekule. S druge strane, joni u rastvoru imaju tendenciju da se još brže kreću u mikrotalasnom polju od polarnih molekula, što dovodi do efikasnijih sudara sa drugim molekulima i do oslobađanja energije u vidu toplote, koja podstiče proces razaranja [92,93].

Klasičan mikrotalasni sistem sastoji se od mikrotalasne peći, rotora u koji se postavljaju kivete od polimernog materijala, sistema za učvršćivanje i kontrolu uslova razaranja. Kompletan proces razaranja je automatizovan i prethodno se zadaje u zavisnosti od tipa uzorka i korišćene smeše rastvarača. Regulator temperature (termosenzor) prati promenu temperature razaranja i na taj način podešava snagu magnetrona (generatora mikrotalasa). Efikasnost razaranja postiže se sistemom za navođenje i fokusiranje mikrotalasa. Kontrola pritiska vrši se pomoću sigurnosnog ventila, s obzirom da je svaka kiveta baždarena na određenu vrednost pritiska. Nakon dostizanja maksimalne vrednosti pritiska, sigurnosni ventil mikrotalasne kivete se otvara i tako omogućava ispuštanje gasova do ponovnog uspostavljanja pritiska baždarenja. Istovremeno se snižava snaga magnetrona jer nagle promene pritiska i temperature mogu da izazovu egzotermne reakcije kod uzoraka s visokim sadržajem organske materije, poput kliničkih uzoraka. Nastala kisela (ili druga toksična) isparenja uklanjaju se aspiratorom [92,93].

Mikrotalasna digestija je metoda izbora za pripremu čvrstih tkiva i nekih tečnih kliničkih uzoraka. Nedostatak metode je u ceni kompletne instrumentacije i održavanju njenih delova. To se prvenstveno odnosi na mikrotalasne kivete, koje se izrađuju od hemijski inertnog polimernog materijala otpornog na visoke temperature i transparentnog za mikrotalasne zrake. Kako većina polimernih materijala kreće da se deformiše na temperaturama većim od 250°C, celokupni proces razaranja se obično podešava do 200°C. Danas su dostupni sistemi sa većim setom kiveta manjih zapremina čime je moguće smanjiti polaznu masu uzorka, utrošak kiseline i drugih reagenasa i na kraju sam faktor razblaženja razorenog uzorka [92,93].

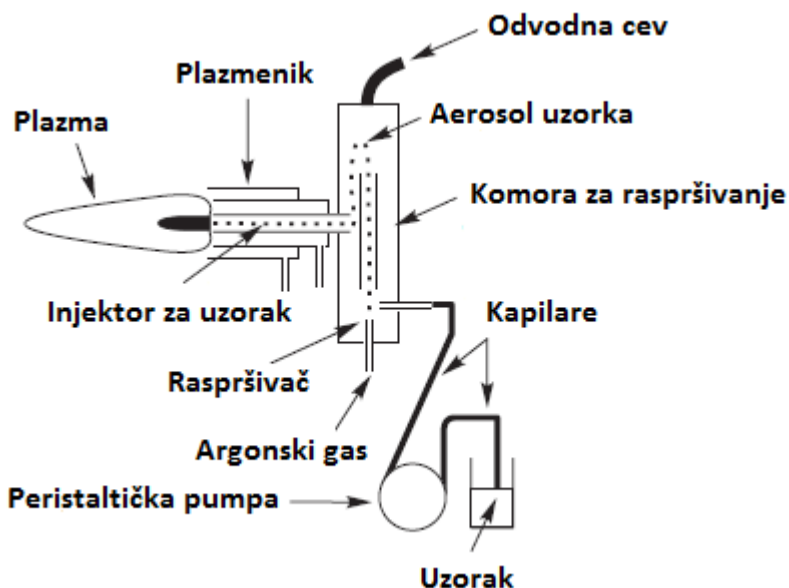
2.6.2. Induktivno spregnuta plazma

U novije vreme se za određivanje metala u kliničkim uzorcima koriste metode zasnovane na induktivno spregnutoj plazmi (engl. inductively coupled plasma – ICP). Metoda izbora za kvantifikaciju makro- i mikroelemenata je induktivno spregnuta plazma sa optičkom emisijom spektrometrijom (ICP-OES), dok se za određivanje elemenata u (ultra)tragovima koristi metoda induktivno spregnute plazme sa masenom spektrometrijom (ICP-MS) [94-99].

Više je razloga za primenu navedene dve metode: analiza velikog broja uzoraka za kratko vreme, multielementarni kapacitet (mogućnost istovremene kvantifikacije više od 70 elemenata), širok opseg linearnosti (od 4 do 6 redova veličine), niska granica detekcije i visoka osetljivost, mali utrošak zapremine uzorka (oko 0,5 mL za ICP-MS i oko 3 mL za ICP-OES), dobra tačnost i

preciznost, mogućnost dobijanja informacija o izotopima (ICP-MS) i odlična reproduktivnost (ICP-OES). Glavni nedostatak obe ICP metode je nemogućnost razlikovanja oksidacionih stanja elementa. Drugi nedostaci se vezuju za nemogućnost određivanja elemenata koji su sastavni deo rastvarača (vodonik, kiseonik, ugljenik), azota iz vazduha, argona (koji se koristi za obrazovanje plazme), halogena koji zahtevaju visoku energiju ekscitacije, žive i zlata (memorijski efekat) i kratkoživećih radionuklida. Takođe, uzorak koji se analizira treba da bude u tečnom stanju. U optimizovanim uslovima rada mogu se prevazići neki od pomenutih nedostataka. Na primer, hidridno-generisane vrste moguće je razdvojiti sa gasno-tečnim separatorom. Primenom visoko pulslog laserskog zraka na „čvrsti“ klinički uzorak može se formirati fini aerosol uzorka i na taj način izbeći korak digestije [94-99].

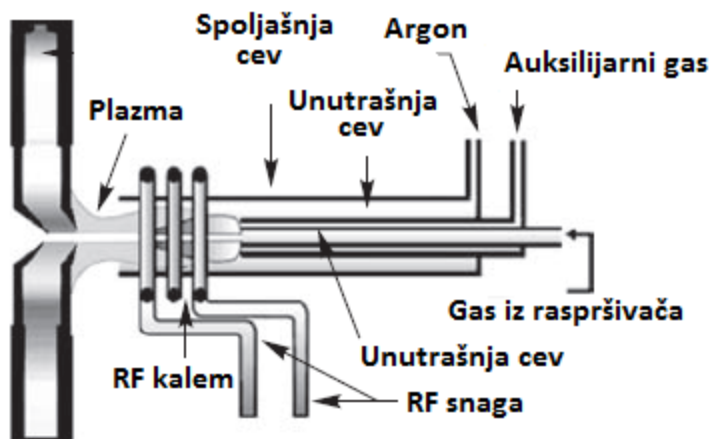
Sistem za uvođenje uzorka i princip obrazovanja plazme isti je za obe analitičke metode. Rastvor uzorka uvodi se peristaltičkom pumpom u raspršivač i komoru za raspršivanje. Pumpa sadrži minirolere koji rotiraju istom brzinom i obezbeđuju relativno konstantan protok tečnosti do raspršivača preko uzanih kapilara zategnutih unutar kanala minirolera. Raspršivanje uzorka se postiže sa argonom i dobijeni fini aerosol uzorka se dalje odvodi do komore za raspršivanje, gde dolazi do selekcije kapljica na osnovu njihove veličine. Jedino se kapljice prečnika između 1-10 μm efikasno transportuju do plazme, dok se kapljice većeg prečnika odvođe u otpad (Slika 11). Sistem za uvođenje uzorka označava se „Ahilovom petom“ obe metode, jer 2 do 5% uzorka nađe svoj put do plazme [97].



Slika 11. Šematski prikaz sistema za uvođenje uzorka (modifikovano iz [97]).

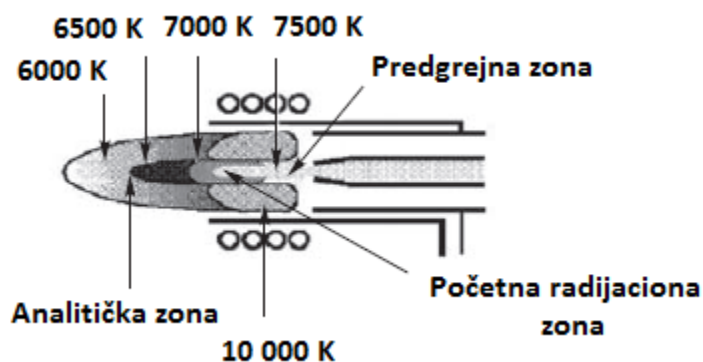
Plazma je visoko jonizovani gas koji provodi elektricitet, a u celini se ponaša kao složen i neutralan sistem sastavljen od atoma i molekula u osnovnom i pobuđenom stanju, elektrona, jona i fotona. Za formiranje plazme neophodan je argon. Argon je inertni, monoizotopski element koji ima veliku energiju jonizacije i mogućnost da eksituje i jonizuje veliki broj elemenata. Sam argon emituje relativno jednostavan spektar. Glavni nedostatak argona je njegova slaba termalna provodljivost u odnosu na molekulske gasove, poput azota. Međutim, azot se više ne koristi za obrazovanje plazme i danas svoju ulogu nalazi u reakcionom režimu rada Q ćelije za uklanjanje poliatomskih smetnji [97].

ICP izvor čine plazmenik, kalem i radiofrekventni (RF) generator. Plazmenik sadrži tri koncentrične cevi – spoljašnju, središnju i unutrašnju, kroz koje protiče argonski gas (Slika 12). Sekundarni (auksilijarni) gas ima ulogu u pozicioniranju plazme, dok tercijerni gas nosi aerosol uzorka do plazme. Kalem je trostruko obmotan oko plazmenika i povezan je sa RF generatorom. Kada se snaga generatora od 750 do 1500 W primeni na kalem, dolazi do oscilacija naizmjenične struje unutar kalema brzinom koja odgovara njegovoj frekvenciji (od 27 do 40 Hz). Oscilacije struje unutar kalema izazivaju stvaranje EM polja u plazmeniku. Oduzimanje elektrona sa atoma argona postiže se primenom visoko naponske varnice na gas koji teče kroz plazmenik. Oduzeti elektroni, koji su zahvaćeni od strane magnetnog polja, sudaraju se sa ostalim atomima argona, čime se postiže oduzimanje još većeg broja elektrona. Ova lančana reakcija dovodi do raspadanja gasa i do formiranja ICP. Nastala plazma ima visoku temperaturu (do 10 000 K), što je čini odličnim atomizerom u odnosu na npr. plamen (3000 K) [97].



Slika 12. Šematski prikaz ICP izvora (modifikovani iz [97]).

Prolaženjem uzorka kroz različito zagrejane regione plazme dolazi do desolvatacije, sušenja, atomizacije i jonizacije uzorka (Slika 13). U analizatorskoj zoni plazme (6000-7000 K) dešavaju se procesi ekscitacije elektrona sa osnovnog stanja i proizvodnje fotona karakterističnih talasnih dužina, što predstavlja osnov *atomske emisije*. S druge strane, u plazmi ima dovoljno energije (15,8 eV) da se ukloni elektron sa atoma i proizvede jon, jer najveći broj elemenata periodnog sistema ima prvi jonizacioni potencijal između 4 i 12 eV, što predstavlja osnov *masene spektrometrije*.



Slika 13. Temperaturni regioni plazme (modifikovano iz [97]).

2.6.2.1. Optička emisiona spektrometrija (OES)

Svaki element ima karakterističan emisioni spektar, koji se sastoji od atomskih i jonskih linija na različitim talasnim dužinama. Izbor atomske (I) ili jonske (II) linije zavisi od ispitivanog elementa i matriksa uzorka. Jonske linije imaju bolju osetljivost od atomskih ako je zbir energija jonizacija i ekscitacija ispod jonizacione energije argona. Neki elementi, poput As i Se, imaju osetljivije atomske linije, dok drugi elementi, poput Cu i Ni pokazuju sličnu osetljivost atomskih i jonskih linija. Intenzitet emitovanog zračenja direktno je srazmeran koncentraciji i povezuje se sa kalibracionom pravom konstruisanom za ispitivani element.

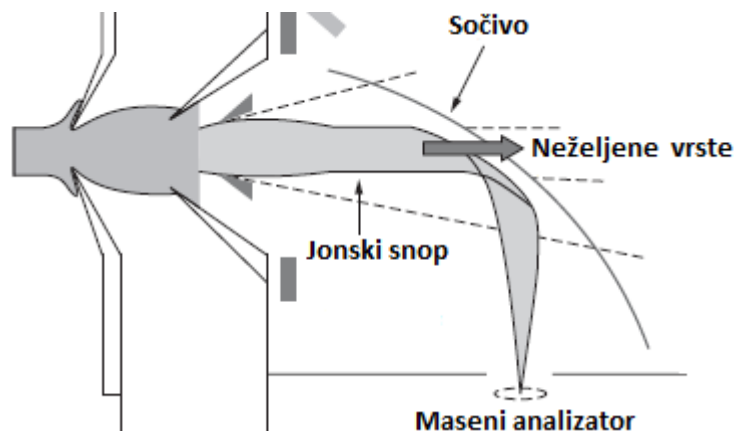
S obzirom da bi 70 elemenata dalo najmanje 70 000 emisionih linija u opsegu od 200-600 nm, neophodno je raspolagati disperzionim sistemima velike snage razdvajanja. Spektrometar služi da razdvoji talasnu dužinu od interesa iz spektra koji emituje izvor. To se postiže na dva načina: sekvencijalno (merenjem jedne talasne dužine) ili simultano (istovremenim merenjem više talasnih dužina). Pomak u tehnologiji detektora načinjen je zamenom fotomultiplikatora sa višekanalnim detektorima, koji se zasnivaju na *uređajima za prenos naelektrisanja*. Ovi detektori

u svom sastavu sadrže čipove od silicijuma na kojima se nalaze desetine hiljada malih dinoda, koje omogućavaju istovremeno merenje svih talasnih dužina iz jedne spektralne oblasti. Fleksibilnost u izboru talasne dužine, mogućnost izbora nekoliko linija za jedan element (u cilju povećanja tačnosti i proširivanja linearnog dinamičkog opsega), kao i mogućnost kvalitativne analize samo su neke od prednosti koje ovi detektori imaju [94-96].

2.6.2.2. Masena spektrometrija (MS)

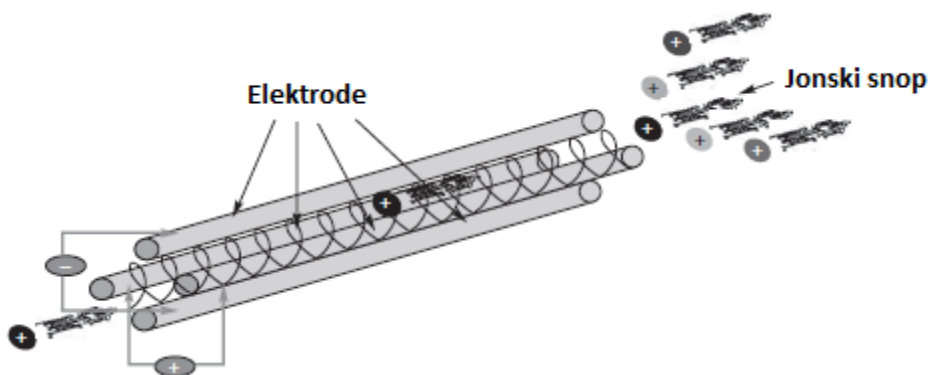
Dve glavne prednosti ICP-MS u odnosu na ICP-OES su jednostavniji spektri i još niža granica detekcije. Čak i kada bi svi elementi periodnog sistema bili prisutni u rastvoru uzorka, na masenom spektru bi se nalazilo 211 pikova (prvenstveno od M^+ jona). ICP-MS metoda služi za određivanje (ultra)tragova elemenata, ali se može koristiti za određivanje elemenata u većim koncentracijama. U odnosu na ICP-OES, gde plazma ima ulogu da proizvodi fotone sa različitim talasnim dužinama procesom relaksacije elektrona, plazma u ICP-MS služi kao izvor pozitivnih jona, gde fotoni predstavljaju neželjene vrste. Proizvodnja i detekcija velikog broja jona zaslužna je za visoku osetljivost i karakteristično niske granice detekcije ICP-MS (čak do *ppq* nivoa).

Raspršivač i komora za raspršivanje se kod ICP-MS sistema hlade sa spoljašnje strane, kako bi se ostvarila termička stabilnost uzorka i smanjio preveliki unos rastvarača u plazmu. Proizvedeni joni u plazmi usmeravaju se ka interfejs regionu, koji ima ulogu da transportuje jone od plazme (koja se održava na atmosferskom pritisku) do masenog spektrometra (koji je pod vakuumom). Interfejs region čine dva metalna kona, prvi sa nešto većim otvorom (0,8-1,2 mm) u odnosu na otvor drugog kona (0,4-0,8 mm). Konovi su od nikla ili platine. Platinski konovi su otporniji na korozivne reagense i samim tim su efikasniji i skuplji. Sadržaj teško rastvornih soli treba držati ispod 0,2% zbog taloženja komponenti matriksa oko otvora konova, posebno oko otvora prvog kona, zbog pada intenziteta signala. Joni koji napuste interfejs region usmeravaju se ka jonskoj optici, koju čini veći broj sočiva i čija je uloga da elektrostatički fokusiraju jonski snop, odnosno da obezbede efikasan transport što većeg broja analitnih jona (M^+) do masenog spektrometra. Zaustavljanje fotona, neutralnih i drugih neželjenih vrsti da dođu do detektora postiže se pomoću fizičke barijere ili elektrostatičkog savijanja jonskog snopa pod 90° direktno u maseni analizator (Slika 14) [97].



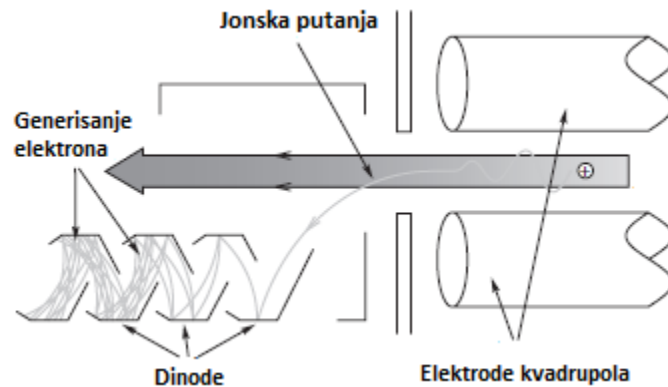
Slika 14. Elektrostatičko savijanje jona pod 90° (modifikovano iz [97]).

Maseni analizator ima ulogu u razdvajanju jona na osnovu njihovog m/z odnosa. Jedan od najkorišćenijih masenih spektrometara je kvadrupol. Kvadrupol se sastoji od četiri elektrode na koje se primenjuje jednosmerna i naizmenična struja, ali na suprotnim parovima elektroda (Slika 15). Ova voltaža se zatim brzo menja zajedno sa RF snagom u cilju propuštanja samo M^+ jona do detektora. Kvadrupol može da razdvoji do 2400 jedinica atomske mase u sekundi. Ova osobina daje ICP-MS metodi multielementarni kapacitet. Takođe, sortiranjem jona na osnovu njihovog odnosa omogućava se dobijanje informacija o izotopima, pošto izotopi jednog elementa imaju različite atomske mase [97].

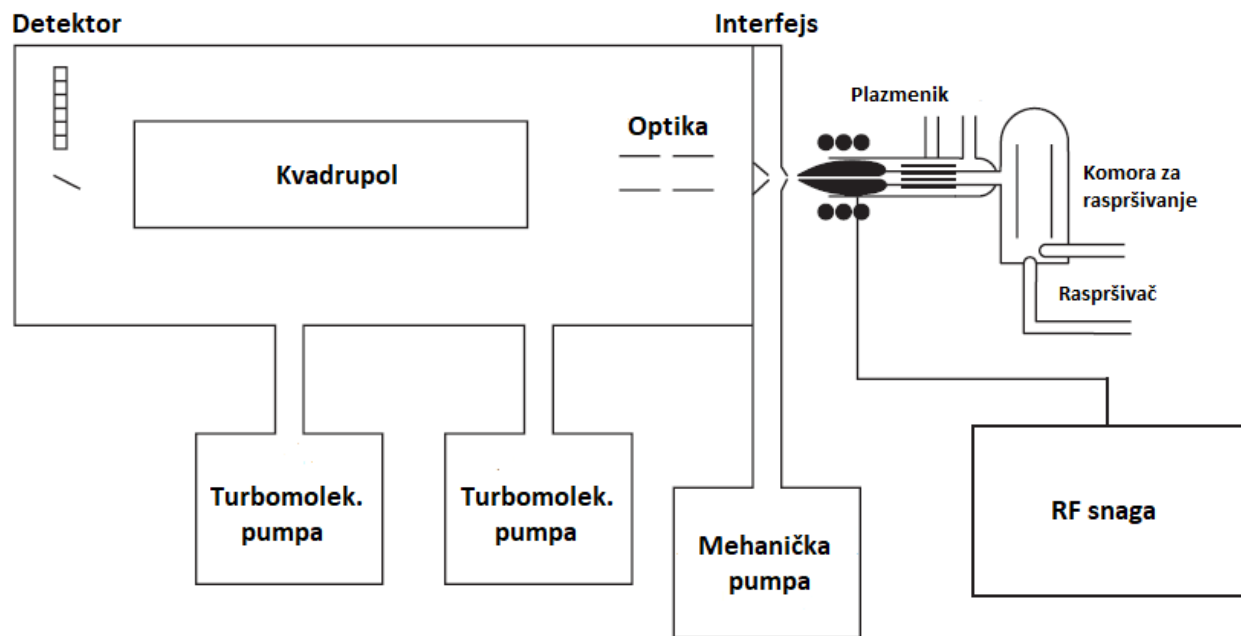


Slika 15. Šematski prikaz masenog razdvajanja sa kvadrupolom (modifikovano iz [97]).

Finalni proces je privlačenje jona od strane negativno naelektrisanе površine detektora i prevođenje broja jonskih udara u električni signal koji može da se izmeri (Slika 16) i poveže sa brojem atoma elementa u rastvoru preko kalibracione prave konstruisane za ispitivani element [97]. Šematski prikaz ICP-MS metode prikazan je na Slici 17.



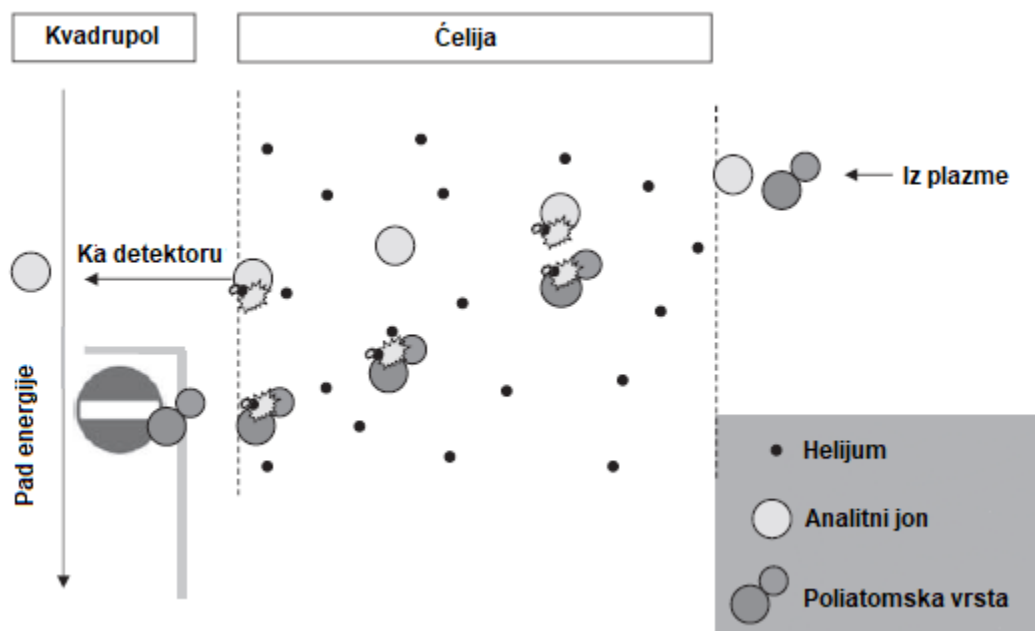
Slika 16. Dinodni multiplikator elektrona (modifikovano iz [97]).



Slika 17. Šematski prikaz ICP-MS metode (modifikovano iz [97]).

Spektralna preklapanja su najčešći tip smetnji u ICP-MS metodi. Poliatomske smetnje se umanjuju propuštanjem helijuma kroz Q ćeliju. Princip uklanjanja poliatomskih smetnji zasniva se na razlici u kinetičkim energijama između poliatomskih i analitnih jona. Kako su poliatomski joni (npr. $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$) fizički veći od analitnih ($^{75}\text{As}^+$), oni će se učestalije sudarati sa helijumom od analitnih i tako gubiti veću količinu kinetičke energije (Slika 18). Nedostatak razdvajanja na osnovu razlika u kinetičkim energijama (engl. kinetic energy discrimination – KED) je pad u osjetljivosti signala za analite male mase (npr. litijum, berilijum) [97].

Nespektralne (matriksne) smetnje direktno zavise od sastava ispitivanog uzorka i rezultat su razlika koje se javljaju u viskoznosti uzoraka i standardnih rastvora, taloženja soli oko otvora konova, memorijskog efekta i promena uslova u plazmi. Ova vrsta smetnji uglavnom dovodi do supresije signala, ali u pojedinim slučajevima može da dovede do povećanja šuma signala. One se jednostavno mogu umanjiti upotrebom internih standarda. Idealan interni standard treba da bude neometajuća, monoizotopska vrsta koja se ne nalazi u rastvoru i čije se fizičke osobine slažu sa analitnim i koje se ne menjaju sa promenom eksperimentalnih uslova. Interni standard se jednako dodaje ili distribuira kako u uzorak tako i u standardne rastvore i slepu probu. U radu sa kliničkim uzorcima dovoljno je pokriti maseni opseg sa tri interna standarda, mada se može koristiti i veći broj odgovarajućih internih standarda [100].



Slika 17. Princip uklanjanja poliatomskih smetnji sa helijumom (modifikovano iz [97]).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Sakupljanje uzoraka tkiva

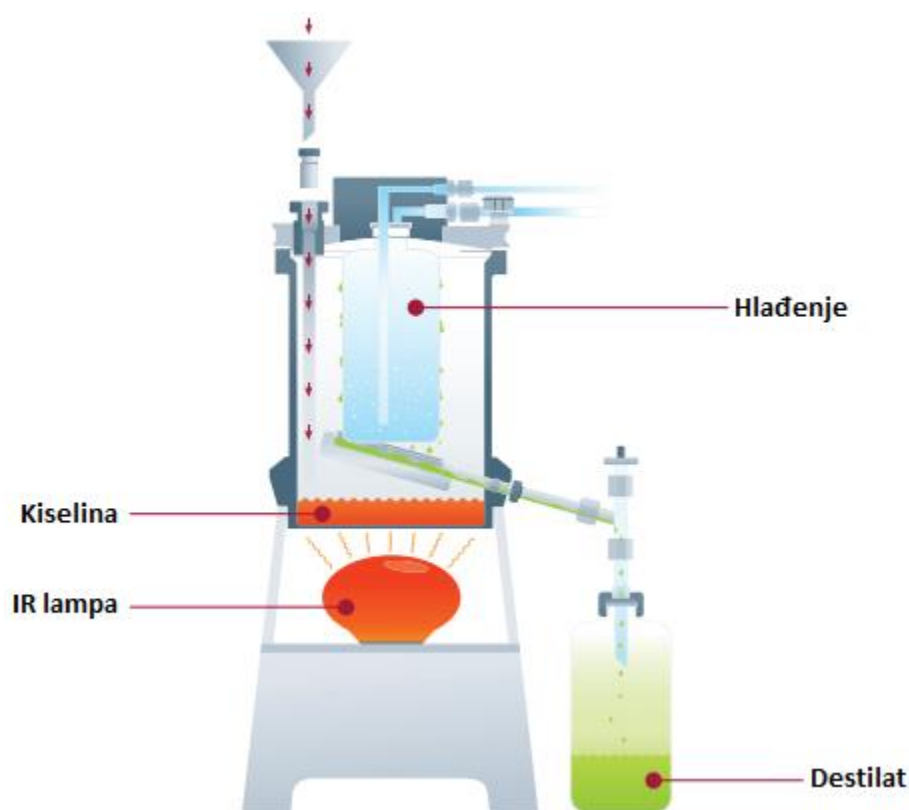
U studiji je učestvovalo 200 pacijenata, od toga 21 pacijent sa dijagnozom Hašimotovog tiroiditisa (HT), 62 pacijenta sa dijagnozom koloidne strume (KS), 36 pacijenata sa dijagnozom benignog tumora (BT) i 81 pacijent sa dijagnozom malignog tumora tiroidne žlezde (70 sa papilarnim karcinomom, 8 sa folikularnim i troje sa medularnim karcinomom). Tkivni materijal je uzorkovan u Centru za endokrinu hirurgiju Kliničkog Centra Srbije u Beogradu, u skladu sa Etičkom dozvolom Etičkog Komiteta Kliničkog Centra Srbije u Beogradu (br. 1575/5). Svaki pacijent je dobrovoljno i pismeno dao svoj pristanak da učestvuje u ovom istraživanju. Odlukom Etičkog odbora Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu odobrena je upotreba humanog materijala za potrebe ove disertacije (br. 1-12/18).

Uzorci tkiva su dobijeni nakon operacije tiroidne žlezde. Od pacijenata sa benignim i malignim tumorom uzorkovano je i zdravo tiroidno tkivo (ZTT) sa najveće moguće udaljenosti od primarnog tumora, koji je bio jasno demarkiran ($n = 117$). Preoperativna dijagnoza oboljenja tiroidne žlezde postavljena je na osnovu citološkog nalaza punktata dobijenog aspiracionom biopsijom. Ova dijagnostička procedura je rutinski sprovedena kod svih pacijenata sa sumnjivim nodusom, uz dodatnu radiološku i funkcionalnu dijagnostiku. Definitivna dijagnoza malignih i benignih oboljenja tiroidne žlezde potvrđena je na osnovu patohistološke analize postoperativno dobijenog uzorka tkiva od strane dva nezavisna patologa. Patohistološkom analizom ZTT-a nije ustanovljeno prisustvo bilo koje patološke promene.

Od pacijenata su sakupljeni podaci o polu, uzrastu, pušačkom statusu, prethodnoj istoriji oboljenja tiroidne žlezde u porodici, ultrasonografskoj veličini nodusa, prisustvu retrosternalnog rasta, PH dijagnozi, TNM stadijumu bolesti, postojanju invazije tiroidne kapsule i multicentrične diseminacije. Da bi se izbegao uticaj endogenih faktora, iz istraživanja su isključeni pacijenti sa drugim tipovima maligniteta, hroničnim oboljenjima jetre i bubrega, dijabetesom, infektivnim i drugim bolestima koje bi mogle da utiču na koncentraciju metala.

3.2. Hemikalije i instrumenti

Sve korišćene hemikalije bile su analitičke čistoće i bile su nabavljene od proizvođača „Merk“-a (Darmstad, Nemačka). Azotna kiselina je dodatno prečišćena pomoću „Berghof“-ovog aparata za destilaciju koncentrovanih kiselina (BSB-939-IR) (Slika 19). Za pripremu standardnih rastvora, uzoraka i slepe probe korišćena je ultračista voda (otpornosti $\geq 18.2 \text{ M}\Omega$). Ultračista voda je dobijena propuštanjem destilovane vode kroz „Milli Q Plus“ sistem (Merk, Darmstad, Nemačka). U cilju sprečavanja kontaminacije, korišćeni plastični i stakleni materijali ostavljeni su potopljeni 24 h u 10% azotnoj kiselini i pre upotrebe su dobro isprani sa ultračistom vodom.



Slika 19. Aparat za destilaciju azotne kiseline. Kiselina se zagreva sa infracrvenom (IR) lampom i snaga lampe se podešava da temperatura bude 10-20°C ispod temperature ključanja kiseline. Na ovaj način se sprečava unos nečistoća koje zaostaju u talogu. Redestilacijom se može postići još veći stepen čistoće destilovane kiseline.

Za pripremu međustandardnih rastvora korišćen je komercijalni multielementarni rastvor koncentracije 10 mg/L (VHG Labs, Mančester, Engleska). Za korekciju matriksnih smetnji

korišćen je komercijalni rastvor internog standarda (100 mg/L ^7Li i Sc; 20 mg/L Bi, Ga, In, Tb, Y) od istog proizvođača. Uzorci su razoreni u mikrotalasnom digestoru (ETHOS 1, Milestone, Italija). Elementi su kvantifikovani sa ICP-MS aparatom (iCAP Q, Thermo Scientific, Engleska) (Slika 20).



Slika 20. ICP-MS aparat (iCAP Q_c, Thermo Scientific).

Za obrazovanje plazme i raspršivanje uzorka korišćen je argon visoke čistoće (99,999%), snabdeven od “Messer”-a, Pančevo, Srbija. Kolizijska ćelija punjena je sa helijumom (99,999%), takođe snabdevenim od “Messer”-a. Glavne karakteristike ICP-MS date su u Tabeli 3.

Tabela 3. Glavne karakteristike ICP-MS instrumenta.

	Karakteristike
Peristaltička pumpa	Niskopulsirajuća, 12 minirolera, 4 kanala
Raspršivač	Koncentrični, stakleni
Komora za raspršivanje	Ciklonska, kvarcna
Protok gasa	
gas za hlađenje	0,80 L/min
pomoćni gas	1,13 L/min
gas za transport uzorka	16 L/min
RF generator	27 MHz, snage od 500 do 1600 W (optimalno 1,55 kW)
Kalem	Bakarni, obložen srebrom
Plazmenik	Kvarcni
„Sampler“ kon	Platinski (otvor prečnika 1,2 mm)
„Skimmer“ kon	Platinski (otvor prečnika 0,8 mm)
Optika	Cilindrična jonska sočiva pod uglom od 90°
Q ćelija	Ar-STD ili He-KED
Maseni analizator	Kvadrupol
Detektor	Diskontinualni dinodni multiplikator elektrona

U cilju dodatne potvrde rezultata merenja, elementi čije su koncentracije bile veće od 10 µg/L dodatno su kvantifikovani metodom induktivno spregnute plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom (ICP-OES, iCAP 6500 Duo Spectrometer, Thermo Scientific, Engleska) (Slika 21). Glavni instrumentalni parametri ICP-OES metode i izabrane talasne dužine prikazane su u Tabeli 4.



Slika 21. ICP-OES aparat (iCAP 6500 Duo Spectrometer, Thermo Scientific).

Tabela 4. Instrumentalni parametri ICP-OES i izabrane talasne dužine.

	Vrednosti	
RF snaga (W)	1150	
Spoljni protok gasa (L/min)	12	
Srednji protok gasa (L/min)	0,50	
Centralni protok gasa (L/min)	0,50	
Talasne dužine	Zn (213,856)	Pb (220,353)
	Cu (224,700)	Se (196,022)
	Ni (231,604)	Cd (226,499)
		Mn (257,604)

3.3. Optimizacija i validacija ICP-MS metode

Instumentalni parametri ICP-MS optimizovani su sa „iCAP Q tuning B“ rastvorom, koji sadrži 1 µg/L Ba, Bi, Ce, Co, In, Li i U u 2%-tnoj azotnoj kiselini. Za proveru tačnosti ICP-MS i ICP-OES metode korišćeni su standardni referentni materijali (SRM) pune krvi (Serorm®, SERO210105 L-1 i SERO210205 L-3, Norveška). Razblaženi rastvor internog standarda (⁴⁵Sc

od 50 µg/L i ⁸⁹Y, ¹⁵⁹Tb, ²⁰⁹Bi od 10 µg/L) uveden je preko zasebne cevčice na peristaltičkoj pumpi i tako jednako distribuiran u slepu probu, standardne rastvore i uzorke.

Šest standardnih rastvora u opsegu od 1 do 300 µg/L bilo je dovoljno da se postigne odlična linearnost kalibracione prave za svaki ispitivani element ($r > 0.999$). Svi raspoloživi izotopi elementa snimani su u standardnom (argonovom) i kolizionom (helijumovom) modu. Rezultati merenja su međusobno upoređeni sa deklarisanim vrednostima SRM-a. Veća tačnost za ispitivane elemente dobijena je pomoću kolizionog moda i selektovani izotopi prikazani u Tabeli 5, zajedno sa *recovery* (*R*) vrednostima. Tačnost metode bila je u opsegu od 92,06 do 121,01%. Relativna standardna devijacija (RSD) merenja bila je manja od 5%.

Tabela 5. Poređenje dobijenih vrednosti sa deklarisanim vrednostima SRM-a za selektovane izotope.

	Puna krv (L-1) (µg/L)			Puna krv (L-3) (µg/L)		
	Pronađeno	Deklarisano	<i>R</i> (%)	Pronađeno	Deklarisano	<i>R</i> (%)
⁶⁰ Ni	1,67	1,38	121,01	16,66	15,90	104,78
⁶⁵ Cu	0,58	0,63	92,06	1,50	1,34	111,94
⁶⁶ Zn	4,08 ^a	4,20 ^a	97,14	6,88 ^a	7,10 ^a	96,90
²⁰⁸ Pb	11,10	9,90	112,12	350	337	103,86
⁷⁸ Se	56,05	60	93,42	171	161	106,21
⁵⁵ Mn	17,42	18,4	94,67	30,01	31,40	95,57
¹¹¹ Cd	0,32	0,28	114,29	5,18	5,01	103,39
⁷⁵ As	4,76	4,60	103,48	16,22	14,10	115,04
²³⁸ U	0,169	0,18	93,89	0,170	0,18	94,44

^a Koncentracija izražena u mg/L

Isti standardni referentni materijali korišćeni su za proveru tačnosti ICP-OES metode i selektovane talasne dužine za ispitivane elemente date u Tabeli 4 odgovaraju najvećoj tačnosti sa deklarisanim vrednostima SRM-a.

3.4. Mikrotalasna priprema uzorka

Približno 0,5 g uzorka tiroidnog tkiva je prebačeno u mikrotalasnu kivetu i tačna masa je odmerena na analitičkoj vagi. Uzorci tkiva su razoreni sa koncentrovanom azotnom kiselinom i koncentrovanim vodonik-peroksidom u zapreminskom odnosu 7:1 prema sledećem režimu rada mikrotalasnog digestora: 5 minuta na 140°C, 5 minuta na 185°C i dodatnih 20 minuta na 185°C. Razoreni uzorci su ohlađeni, kvantitativno prebačeni u normalne sudove od 25 mL i razblaženi

ultračistom vodom do crte. Liofilizovan SRM je prvo rekonstruisan prema uputstvu proizvođača i zatim je pripremljen na isti način kao što je opisano za uzorke tkiva.



Slika 21. Mikrotalasni digestor (ETHOS 1, Milestone) sa setom od 10 kiveta.

3.5. Statistička analiza

Za uni- i multivarijantnu obradu podataka korišćen je SPSS program (IBM Statistics 20). Raspodela podataka proverena je sa Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom da rezultati nisu bili jednako distribuirani, neparametrijski testovi (*Mann-Whitney U test* i *Kruskal-Wallis-ov test*) su korišćeni za poređenje sadržaja metala između grupa. Od mera centralne tendencije korišćena je medijana, dok je od mera varijabiliteta korišćen interkvartilni opseg (engl. interquartile range – IQR). Korelacija između sadržaja svih metala ispitana je sa Spearman-ovim testom i jedino su razmatrane korelacije sa $r_s > 0,60$. Analiza glavnih komponentata (engl. principal component analysis – PCA) i linearno diskriminantna analiza (LDA) sprovedene su u okviru PLS ToolBox paketa (Eigenvectors Inc.v.6.2.1) u okviru MATLAB verzije 7.12.0 (R2011a) (MathWorks INC, SAD). Za PC analizu korišćen je *Singular Value Decomposition* (SVD) algoritam i 95%-tni nivo pouzdanosti za Hottelling-ovu raspodelu. U slučaju veoma dobrog razdvajanja sadržaja metala sa PCA, dodatno je primenjena metoda delimično najmanjih kvadrata s diskriminatornim pristupom (Partial Least Square-Discriminant Analysis – PLS-DA), takođe u okviru PLS Tool Box paketa. Prihvaćeni nivo značajnosti za svaki statistički test bio je $p < 0,05$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

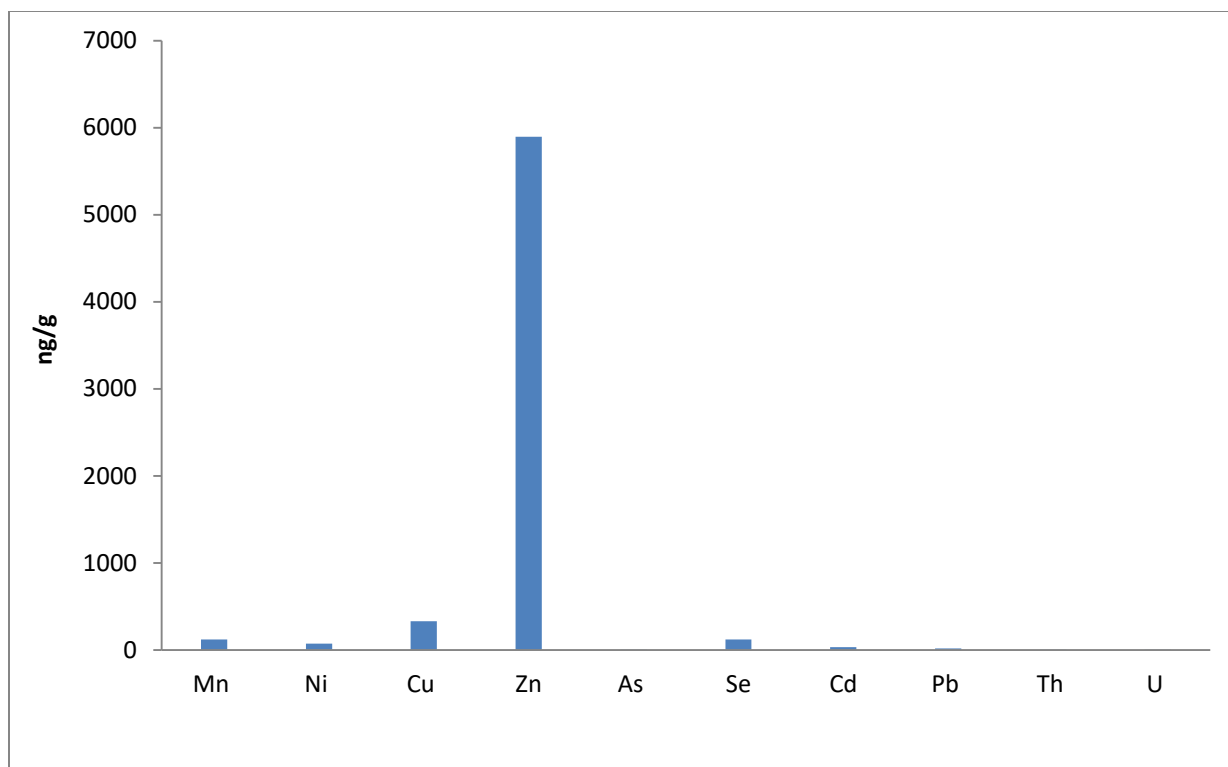
4.1. Zdrava tiroidna tkiva

Koncentracija metala određena je u 117 uzoraka zdravog tiroidnog tkiva (ZTT). Dobijen je sledeći redosled zastupljenosti metala u ispitivanim uzorcima: $Zn > Cu > Mn > Se > Ni > Cd > Pb > As > Th > U$. Najzastupljeniji metal bio je Zn, dok je sadržaj Th i U detektovan u ultratragovima (Slika 23). U cilju što jasnijeg sagledavanja grafičke raspodele metala u zavisnosti od A) pola, B) starosne kategorije i C) konzumiranja duvana, sa Slike 24 su isključene vrednosti za Zn. Parametri deskriptivne statistike za sve metale dati su u Tabeli 6.

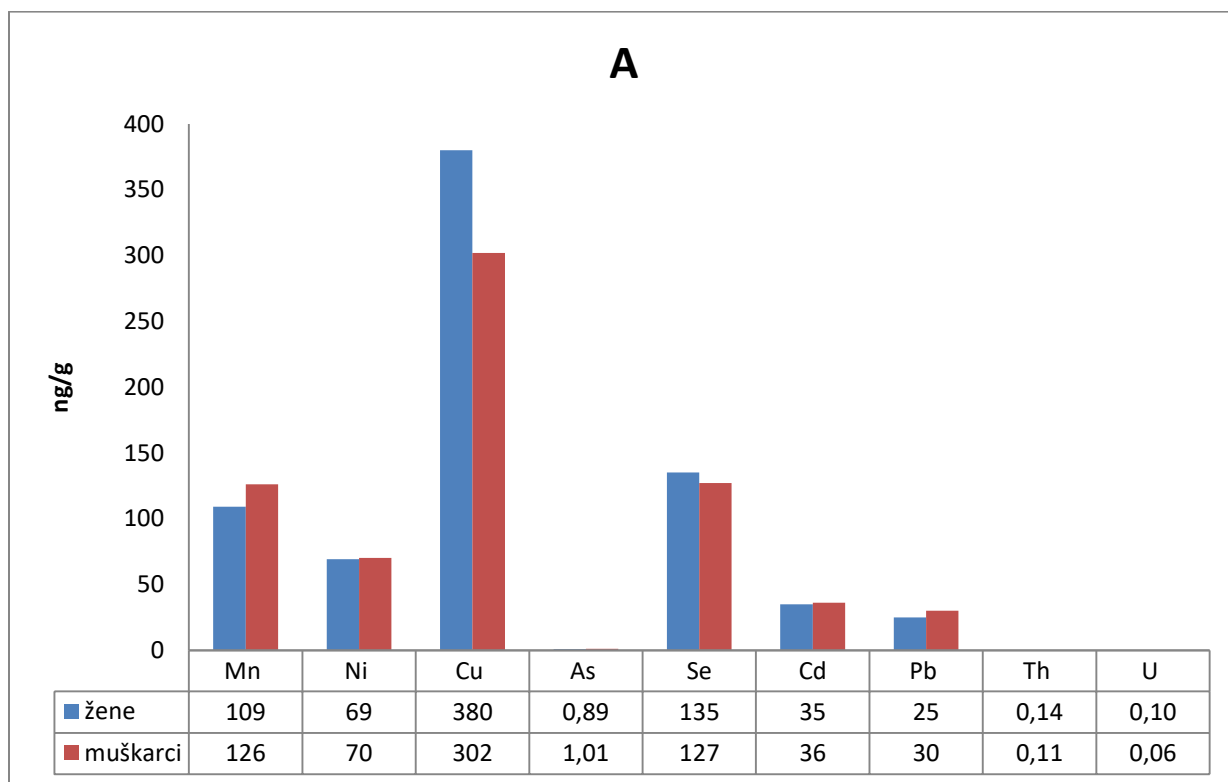
Tabela 6. Parametri deskriptivne statistike za sadržaj ispitivanih metala u ZTT (ng/g).

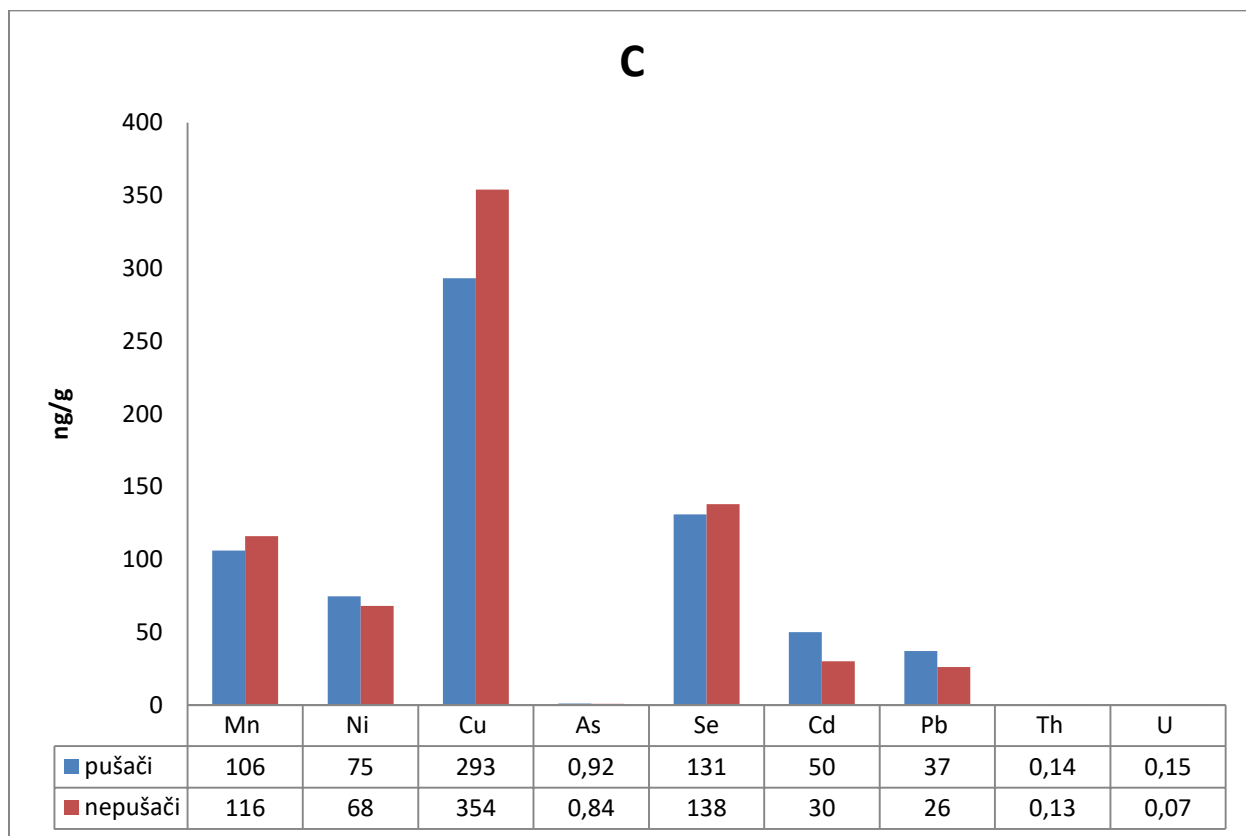
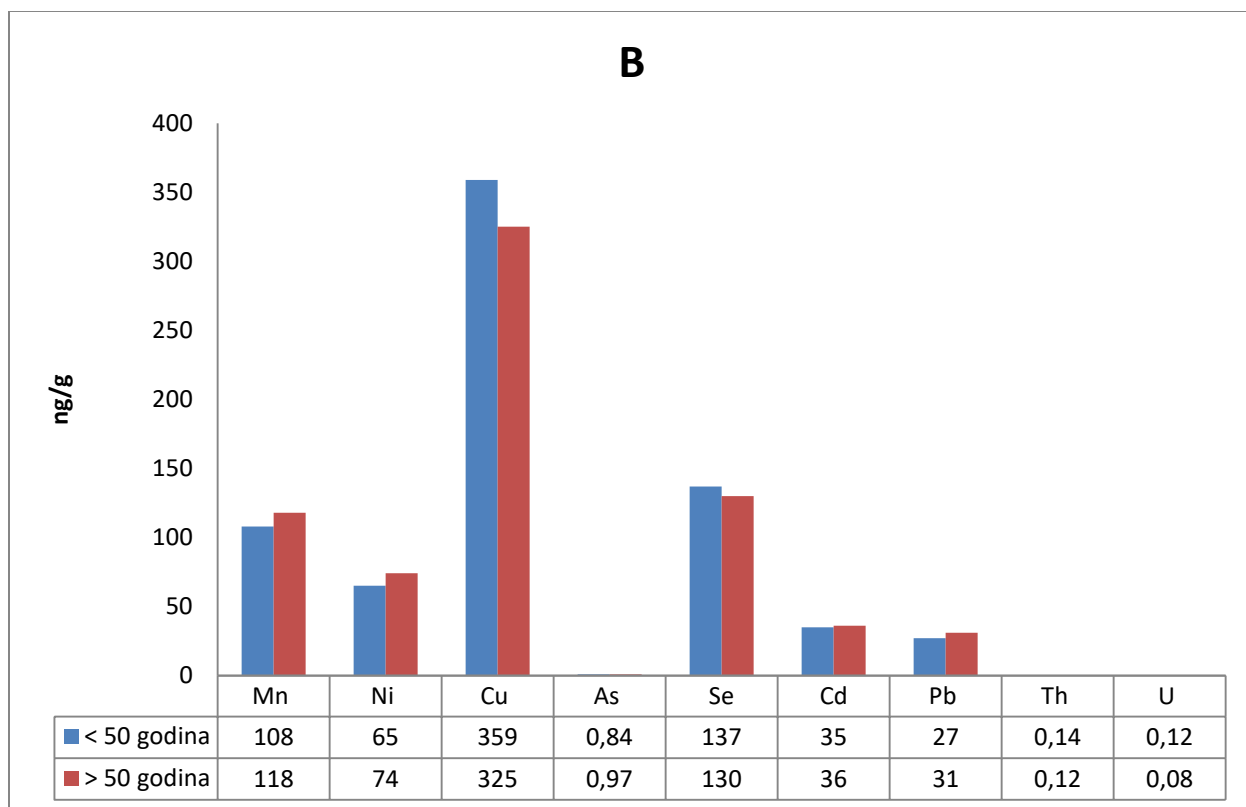
		Mn	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U
ZTT	medijana	119	75	337	5875	0,89	145	40	28	0,20	0,09
	IQR	77	50	209	4152	0,76	115	50	40	0,19	0,16
	min	30	15	108	1319	0,07	26	2,42	5,01	0,01	0,01
	max	404	186	2018	11383	4,38	496	128	106	0,97	0,46

Na osnovu preporuka koje su donele Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju i Međunarodna federacija za kliničku hemiju i laboratorijsku medicinu, referentne vrednosti za sve klinički-značajne metale prikazane su u percentilima (P) u opsegu 2,5-97,5% i izračunate su kao donji limit (DL) i gornji limit (GL) 95%-tnog intervala pouzdanosti. Rezultati su dati u Tabeli 7, zajedno sa vrednostima geometrijske srednje vrednosti (engl. geometric mean – GM). U Tabeli 7 je takođe prikazan sadržaj metala na osnovu razlika u polu (žene/muškarci = 80/37), godina (< 50 naspram > 50 godina = 56/61) i konzumiranja duvana (pušači/nepušači = 37/80). Statistički značajna razlika između dva seta podataka potvrđena je sa *Mann-Whitney U* testom. Utvrđeno je da je sadržaj Cu, Th i U bio značajno veći kod žena, dok je sadržaj Zn bio značajno veći kod muškaraca. Sadržaj Zn je takođe bio značajno povećan u starijoj starosnoj grupi, dok je sadržaj U bio smanjen. Deklarisani pušači, koji su se za vreme anketiranja izjasnili da konzumiraju više od deset cigareta dnevno, imali su značajno povećan sadržaj Cd, Pb i U u poređenju s nepušačima (ispitanicima koji su se za vreme anketiranja izjasnili da ne konzumiraju cigarete).



Slika 23. Grafički prikaz GM vrednosti za sadržaj metala u ZTT (ng/g).





Slika 24. Distribucija sadržaja metala u ZTT na osnovu A) pola, B) uzrasta i C) konzumiranja duvana.

Tabela 7. Sadržaj metala u ZTT (ng/g) u zavisnosti od pola, starosne kategorije i konzumiranja duvana.

Metal	Grupa	GM	Percentili (P)								95% interval		p-vrednost
			P2,5	P5	P10	P25	P50	P75	P95	P97,5	LL	GL	
Mn	Ukupno	113	35	48	56	78	119	153	230	274	116	139	> 0,05
	Pol												
	Žene	109	34	43	52	73	117	153	229	267	113	137	
	Muškarci	126	58	60	69	99	129	153	229	266	126	149	> 0,05
	Starost												
	< 50 godina	108	34	39	52	71	115	152	229	276	113	136	
	> 50 godina	118	50	55	64	91	120	166	231	259	119	143	> 0,05
	Pušački status												
	Pušači	106	34	45	55	84	105	147	211	224	108	132	
	Nepušači	116	39	49	59	76	120	164	238	274	120	143	> 0,05
Ni	Ukupno	69	15	21	25	38	75	134	166	175	73	98	
	Pol												
	Žene	69	15	21	24	40	74	134	154	170	72	97	> 0,05
	Muškarci	70	19	23	26	37	85	131	170	178	76	101	
	Starost												
	< 50 godina	65	15	21	26	38	73	114	163	174	68	93	> 0,05
	> 50 godina	74	19	21	24	42	97	139	158	172	78	103	
	Pušački status												
	Pušači	75	22	27	32	40	80	142	175	177	81	105	> 0,05
	Nepušači	68	15	21	23	39	74	130	153	155	71	96	
Cu	Ukupno	333	144	153	164	244	337	452	715	770	337	419	< 0,05
	Pol												
	Žene	380	177	205	222	261	364	498	736	802	365	446	
	Muškarci	302	115	144	157	232	303	410	600	796	312	394	> 0,05
	Starost												
	< 50 godina	359	114	134	186	242	359	482	857	1273	401	483	> 0,05
	> 50 godina	325	145	155	162	246	314	450	685	711	318	400	
	Pušački status												
	Pušači	293	112	142	156	206	291	386	674	711	293	375	> 0,05
	Nepušači	354	145	158	207	256	356	455	732	770	358	440	

Zn	Ukupno	5576	1925	2616	3220	4000	5875	8122	10000	10411	5678	6556	
	Pol												< 0,05
	Žene	5332	1846	2056	3036	3863	5638	7500	9939	10345	5446	6323	
	Muškarci	6469	3114	3285	3629	5380	7329	8581	9921	10526	6451	7329	
	Starost												< 0,05
	< 50 godina	5181	2043	2616	2960	3703	5218	7500	9627	9944	5245	6123	
	> 50 godina	6038	1766	2840	3689	4836	6193	8735	10260	10498	6149	7026	
	Pušački status												> 0,05
	Pušači	5716	2128	3074	3418	4176	5918	8050	10484	11148	5813	6691	
	Nepušači	5510	1815	2616	3028	3898	5864	8167	9699	10184	5614	6492	
As	Ukupno	0,90	0,09	0,19	0,36	0,57	0,89	1,33	3,95	4,30	1,08	1,50	
	Pol												> 0,05
	Žene	0,87	0,09	0,18	0,35	0,57	0,87	1,40	4,05	4,30	1,07	1,50	
	Muškarci	1,01	0,36	0,40	0,47	0,67	0,91	1,14	3,95	4,03	1,10	1,52	
	Starost												> 0,05
	< 50 godina	0,84	0,12	0,20	0,35	0,49	0,78	1,40	4,26	4,34	1,01	1,43	
	> 50 godina	0,97	0,13	0,22	0,42	0,64	0,93	1,28	3,95	4,10	1,16	1,58	
	Pušački status												> 0,05
	Pušači	0,92	0,09	0,20	0,36	0,57	0,89	1,43	4,20	4,30	1,18	1,60	
	Nepušači	0,85	0,19	0,22	0,36	0,68	0,89	1,25	3,32	3,52	0,87	1,29	
Se	Ukupno	133	33	40	55	88	145	202	350	400	144	180	
	Pol												> 0,05
	Žene	135	33	36	54	88	150	202	374	435	149	185	
	Muškarci	127	49	54	58	84	136	201	273	285	128	164	
	Starost												> 0,05
	< 50 godina	137	37	41	56	88	146	200	350	391	149	185	
	> 50 godina	130	33	37	53	83	145	202	311	415	139	175	
	Pušački status												> 0,05
	Pušači	131	33	38	54	89	144	201	339	448	141	177	
	Nepušači	138	46	53	56	78	153	208	353	384	150	186	
Cd	Ukupno	34,8	4,1	6,4	10,4	21,3	40,5	70,2	107	110	40,6	52,6	
	Pol												> 0,05
	Žene	34,5	4,2	5,6	10,2	21,3	40,4	71,8	106	109	40,6	52,5	
	Muškarci	35,9	8,2	11,8	15,1	21,1	38,6	60,5	107	116	40,5	52,6	
	Starost												> 0,05

Pb	< 50 godina	35,6	5,1	9,5	10,3	22,4	40,5	69,1	108	110	40,9	52,9	< 0,05
	> 50 godina	35,6	3,8	6,7	11,4	21,3	40,4	72,2	105	109	41,4	53,4	
	Pušački status												
	Pušači	49,9	20,7	20,7	22,9	30,7	57,2	73,6	101	109	49,9	61,9	
	Nepušači	29,5	3,9	4,2	10	15,8	34,9	61,4	100	106	35,9	47,8	> 0,05
	Ukupno	29,1	9,6	10,5	11,7	15,5	28,1	55	81	100	32,5	41,6	
	Pol												
	Žene	25,1	9,6	10,7	11	15,1	21	45,5	68	74	27,2	36,3	
	Muškarci	30,3	9,7	10,4	12,7	16,7	29,9	55	81	102	34	43,1	> 0,05
	Starost												
	< 50 godina	26,6	8,8	10,8	11,9	15,3	22,2	52	76	92	30	38,7	
	> 50 godina	31,4	9,8	10,4	11,3	17,1	35	57,5	82	92	35	44,2	
	Pušački status												< 0,05
Th	Pušači	36,8	11,9	13,4	15,4	19,2	43,1	66,8	81	83	40,2	49,3	< 0,05
	Nepušači	25,9	7,4	10,4	10,9	14,4	24,2	46,5	81	100	28,8	37,9	
	Ukupno	0,13	0,01	0,04	0,07	0,09	0,12	0,15	0,67	0,78	0,14	0,24	
	Pol												
	Žene	0,14	0,01	0,04	0,08	0,10	0,12	0,16	0,67	0,85	0,16	0,25	< 0,05
	Muškarci	0,11	0,02	0,06	0,07	0,08	0,11	0,14	0,25	0,49	0,10	0,19	
	Starost												
	< 50 godina	0,14	0,02	0,08	0,09	0,11	0,12	0,14	0,79	0,90	0,16	0,26	
	> 50 godina	0,12	0,01	0,03	0,06	0,09	0,11	0,16	0,53	0,60	0,12	0,22	> 0,05
	Pušački status												
	Pušači	0,14	0,02	0,07	0,10	0,11	0,12	0,16	0,62	0,67	0,15	0,24	
	Nepušači	0,13	0,01	0,05	0,07	0,09	0,11	0,15	0,63	0,83	0,14	0,23	
	Ukupno	0,09	0,01	0,02	0,02	0,05	0,09	0,20	0,38	0,40	0,11	0,16	< 0,05
	Pol												
U	Žene	0,10	0,02	0,03	0,03	0,05	0,11	0,23	0,39	0,43	0,13	0,17	
	Muškarci	0,06	0,01	0,01	0,02	0,02	0,06	0,12	0,24	0,29	0,07	0,11	
	Starost												
	< 50 godina	0,12	0,02	0,02	0,03	0,05	0,11	0,23	0,38	0,39	0,13	0,17	
	> 50 godina	0,08	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,17	0,33	0,42	0,10	0,14	< 0,05
	Pušački status												
	Pušači	0,15	0,04	0,05	0,05	0,07	0,16	0,29	0,39	0,40	0,17	0,21	
	Nepušači	0,07	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,17	0,29	0,36	0,09	0,13	

Tiroidna žlezda je histološki i funkcionalno kompleksni endokrini organ. Za normalno funkcionisanje tiroidne žlezde neophodna je optimalna količina mikroelemenata. Svaka promena u koncentraciji elemenata koja ima negativan uticaj na tiroidnu homeostazu naziva se *endokrina disrupcija*. Zbog sposobnosti tiroidne žlezde da akumulira esencijalne i toksične metale [84,101-103] analiza metala u tiroidnom tkivu može da pruži pouzdanije informacije od analize metala u telesnim tečnostima. Međutim, tiroidno tkivo je moguće sakupiti za analizu metala jedino nakon hirurškog zahvata ili autopsije. Ovo je ujedno i glavni razlog za veoma mali broj studija u kojima je metalomika reprezentativno sagledana na tkivnom nivou. S tim u vezi, utrošen je veliki napor (u trajanju od četiri godine) da se obezbede postoperativna tkiva za potrebe ovog istraživanja.

Analiza selen u tiroidnom tkivu može da pruži adekvatne informacije o statusu selen u organizmu. Međutim, treba naglasiti da tiroidna žlezda nije organ sa najvećom koncentracijom selen u organizmu, što je česta literaturna greška. Najbogatiji organi selenom su jetra, mišići i bubrezi. Ako je unos selen u organizam adekvatan, koncentracija selen u jetri i bubrezima biće veće nego u bilo kom drugom organu. Ako je unos selen nedovoljan, koncentracije u mišićima i jetri biće snižene, dok će se rezerve selen crpeti iz bubrega. Za sada postoje dokazi da bubrezi igraju ključnu ulogu u regulisanju nivoa selen u stanjima deficijencije [104].

Poređenjem dobijenih rezultata za metale u ZTT sa literaturnim vrednostima zabeležena je sličnost u njihovoj distribuciji među populacionim grupama, sa izuzetkom selen čiji je sadržaj bio značajno smanjen u srpskoj populaciji. Dobijena vrednost za srpsku populaciju (145 ± 115 ng/g) je, na primer, 5 puta niža kada se upoređi sa poljskom populacijom (710 ± 60 ng/g) [105] i oko 15 puta niža kada se upoređi sa ruskom populacijom (2200 ± 1240 ng/g) [106]. Sličan trend deficita selen u ZTT primećen je dodatnom komparativnom analizom sa drugim populacionim grupama širom sveta [107]. Moguće objašnjenje za značajno smanjen sadržaj selen u ZTT može da bude nedovoljan dnevni unos putem hrane, a kao posledica deficita selen u zemljištu.

Utvrđeno je da je deficijencija selen prisutna među 15% svetske populacije i da dnevni unos selen direktno zavisi od načina ishrane, odnosno od njegovog sadržaja u zemljištu. Dnevni unos selen u Evropi je oko 40 µg, dok se dnevni unos u SAD-u kreće od 93 µg za žene do 134 µg za muškarce. Sadržaj selen u zemljištu u Finskoj je izuzetno nizak, dok je sadržaj selen u Amazonu izuzetno visok. Kina je sa jedne strane deficitarna sa selenom (Kešanova provincija, sa dnevnim unosom selen oko 20 µg), a sa druge strane veoma bogata selenom (Hubei provincija, sa dnevnim unosom do 400 µg i zabeleženim trovanjem selenom – *selenozom*, koju karakteriše

miris daha na beli luk). Razlike u dnevnom unosu selenia postoje i među evropskim zemljama, tj. istočna Evropa je siromašnija selenom od zapadne Evrope [108-110].

Srbija pripada redu zemalja sa značajno smanjenim sadržajem selenia u zemljištu [111]. Prvu veću studiju o statusu selenia u jugoslovenskoj populaciji objavili su Maksimović i saradnici [112], koji su istakli deficijenciju selenia u srpskoj populaciji na osnovu dobijenih rezultata za analizirane namirnice i kliničke uzorke. Autori su istakli da se sadržaj Se u pšenici, belom luku, serumu i dlaci skalpa približava vrednostima koje su zabeležene u endemskim krajevima Kine, u kojima je prvi put okarakterisana patološka deficijencija selenia i po čijim okruzima Kešanova i Kašin-Bekova bolest danas nose ime. Njihovi rezultati su, takođe, ukazali da je koncentracija Se u serumu srpske populacije među najnižom u Evropi (44,2 µg/L) i da odgovara koncentraciji Se u ispitivanoj grupi seruma Finaca koji su se nalazili pod velikim rizikom za razvoj kancera (< 45 µg/L) [112]. Utvrđene vrednosti za selen u plazmi kreću se od 42 µg/L (Finska) do 158 µg/L (Kanada) [113,114]. Kako značajne varijacije u sadržaju selenia postoje širom sveta, univerzalni referentni interval za ovaj mikroelement u krvi ne postoji. Štaviše, međunarodna je preporuka da se referentni interval utvrdi za svaku zemlju i u svim regionima jedne zemlje. Referentni interval za selen u serumu srpske populacije nikada nije utvrđen, a jedan od najzanimljivijih podataka o značaju uvrđivanja referentnog intervala može da bude zabeležena koncentracija selenia u serumu zlatiborčana (63 ± 15 µg/L) koja je daleko veća u odnosu na druge regione Srbije. Takođe, ovaj kraj Srbije poznat je po smanjenoj učestalosti karcinoma, za koje su karakteristične vrednosti Se ispod 45 µg/L [115].

Uključivanje selenia u stočnu hranu u Srbiji za nekoliko kategorija domaćih životinja počinje 1989. godine, a tek 2000. godine ova praksa počinje da se primenjuje na sve kategorije domaćih životinja. Pavlović i sar. [116] analizirali su i uporedili sadržaj selenia u namirnicama za periode 1990-1991 i 2000-2008. U zaključku njihove studije istaknuto je da je sadržaj selenia u namirnicama bio veći u 2008. godini u odnosu na 1991. godinu, ali da je ukupni dnevni unos Se u Srbiji i dalje nedovoljan (40,9 µg).

Esencijalni značaj selenia za čoveka zabeležen je 70-tih godina prošlog veka, kada je primećeno da suplementacija sa Na-selenitom sprečava ili smanjuje kliničke znake/simptome endemske kardiomiopatije (Kešanova bolest) i hronične hondrodistrofije (Kašin-Bekova bolest) [113]. Selen je esencijalni element u tragu i sastavni je deo 21. aminokiseline – selenocisteina, koji ulazi u sastav selenoproteina. Za selenocistein (Sec) je karakterističan nukleotidni triplet na

iRNK (UGA kodon), koji je jedan od tri „stop“ kodona. Druga biohemijska jedinstvenost je što se Sec sintetise na tRNK. Humani selenoproteom se sastoji od 25 selenoproteina. Glavnu grupu selenoproteina čine glutathion peroksidaze (GP_x), jodotironin dejodinaze (DIO1-4), tioredoksin reduktaze (TrxR) i selenoprotein P [117-121]. Nedostatak selena dovodi do smanjene ekspresije selenoproteina koji regulišu ravnotežu tiroidnih hormona, pa se u stanjima deficijencije selena javljaju povećani nivoi T4 i smanjeni nivoi T3 u plazmi [108]. Selenoproteini (glutathion-zavisni antioksidativni enzimi) čuvaju homeostazu tireocita od slobodno-radikalnih oštećenja i regulišu metaboličku kontrolu sinteze i prevođenja tiroidnih hormona u netiroidnim tkivima, u kojima se T4 prevodi do T3 ili inaktivnog izomera, rT3 [119]. Za najadekvatniju ekspresiju selenoproteina potrebno je da koncentracija selena u plazmi bude u intervalu 80-90 µg/L [122].

Direktna korelacija između deficijencije selena i razvoja tiroidnih kancera nije utvrđena, ali sve veći broj studija ukazuje da deficit selena i smanjena ekspresija selenoproteina mogu da predstavljaju potencijalni faktor rizika za razvoj tiroidnih kancera [117].

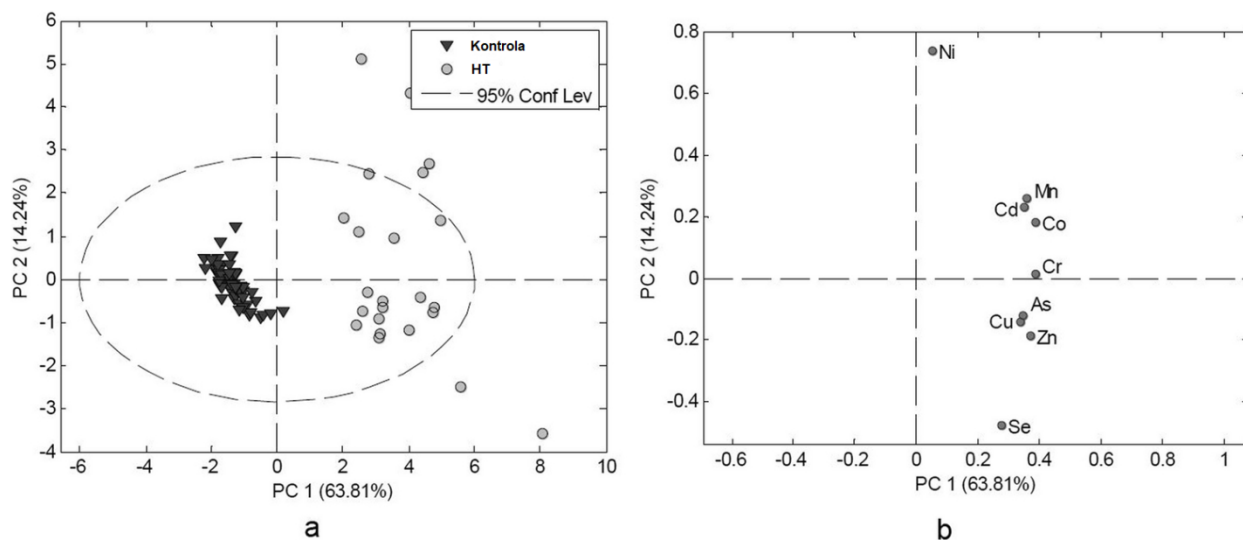
Deficijencija selena u populaciji može se zaustaviti adekvatnim obogaćivanjem hrane ili suplementacijom sa Na-selenitom ili metilovanim jedinjenjima selena, npr. L-selenometioninom ili metilselenocisteinom [117]. Suplementacija selenom pokazala se efikasnom u lečenje blagog oblika Hašimotovog tiroiditisa i Grejvs-Bazedovljeve bolesti [120].

Preporučeni dnevni unos selena za srpsko stanovništvo nikada nije utvrđen. Međunarodna preporuka je oko 60 µg za žene i oko 75 µg za muškarce [108-110].

4.2. Hašimotov tiroiditis

U jednoj od naših prvih studija, sadržaj elemenata u Hašimotovom tiroiditisu ispitan je u serumu male grupe pacijenata ($n = 23$) i upoređen je sa kontrolnom grupom ($n = 70$). Razlika u koncentraciji metala između dve grupe potvrđene je sa *Mann-Whitney* U testom. Utvrđeno je da je koncentracija esencijalnih (Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se) i toksičnih (Ni, As i Cd) metala značajno veća u serumu pacijenata sa HT-om kada se uporedi sa kontrolnom grupom ($p < 0,05$). Pošto je svih devet metala imalo dosta veliki uticaj na razdvajanje HT grupe od kontrole, predložen je jedinstveni profil metala u serumu eutiroidnih pacijenata sa HT-om [123].

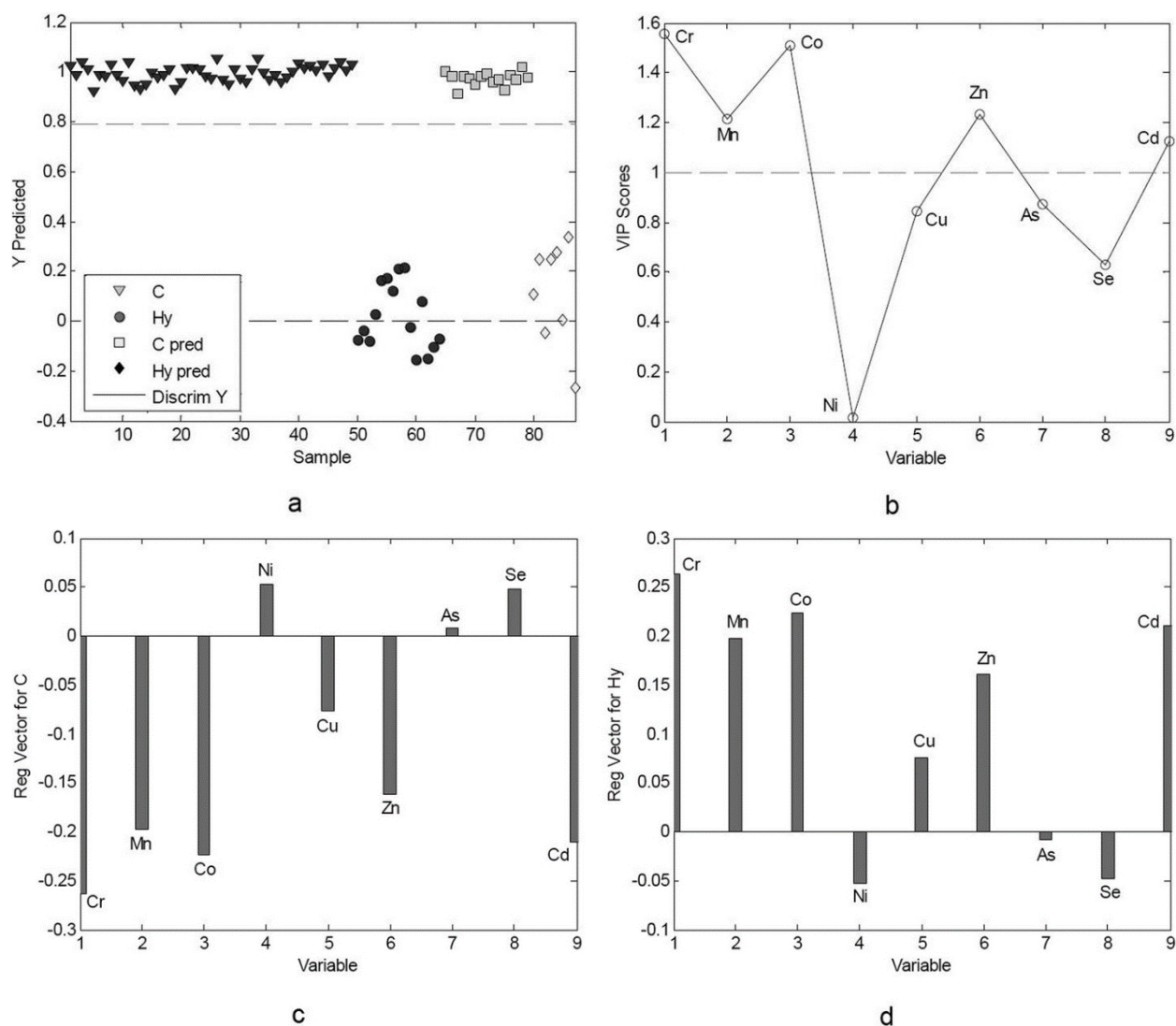
Pored univarijantne statističke analize, primenjene su i multivarijantne metode kako bi se uspostavili kriterijumi za što jasniju klasifikaciju i diferencijaciju ispitivanih uzoraka seruma. Za razdvajanje dve grupe ispitanika primenjena je PCA. Dobijen je trokomponentni PCA model koji objašnjava 90,17% ukupnog varijabiliteta među podacima. Prva komponenta, PC1, obuhvatila je 63,81% ukupnog varijabiliteta podataka, druga komponenta, PC2, 14,21% i treća komponenta, PC3 7,16%. Na Slici 25 prikazana je projekcija faktora skorova (Slika 25a) i uzajamna projekcija koeficijenata latentnih varijabli vektora (Slika 25b) za prve dve (glavne) komponente. Dobijen je značajno visok ukupni varijabilitet podataka obuhvaćen dvema glavnim komponentama, koji bi mogao da odgovara polimorfnosti u kliničkoj prezentaciji bolesti i interindividualnim razlikama između ispitanika. PCA model jasno ukazuju na dve razdvojene grupe uzoraka duž PC1 smera.



Slika 25. PCA model za diferencijaciju dve grupe ispitivanih uzoraka seruma.

S obzirom da je analizom glavnih komponenti dobijeno odlično razdvajanje za sadržaje metala u serumima dve grupe, PLS-DA metoda je zatim primenjena da se pronađu metali koji bi najuticajnije mogli da razdvoje HT grupu od kontrolne. U cilju određivanja stepena tačnosti i osetljivosti PLS-DA modela, čitav set podataka podeljen je na dve podgrupe, kalibracioni set i testirajući set, na osnovu nasumično izabranih koncentracija. Od 70 uzoraka seruma iz kontrolne grupe i 23 uzorka iz HT grupe, kalibracioni set je obrazovan od 55 i 15 uzoraka, dok je testirajući set obuhvatao preostali broj uzoraka. Grafički prikaz skorova dat je na Slici 26a. Diferencijacija varijabli izvršena je na osnovu VIP-a (varijabilnog značaja u rezultatima projekcije). Varijable sa VIP skorom većim od 1 smatrane su najrelevantnijim. Najuticajniji metali koji su razdvojili HT grupu seruma od kontrole bili su Cr, Mn, Co, Zn i Cd (Slika 26b). Standardizovani koeficijenti regresije, na osnovu kojih se može videti značaj pojedinačnih varijabli u regresionim modelima, prikazan su na Slici 26c i Slici 26d. Dobijeni model za HT pokazuje visoke vrednosti regresionih koeficijenata za Cr, Mn, Co, Zn, Cu i Cd i negativne vrednosti za Ni, As i Se. Isti parametri imali su suprotan uticaj na regresioni model u kontrolnoj grupi. Koncentracije metala u kontroli bile su veoma gusto grupisane i pokazivale su mala odstupanja, dok su koncentracije metala u serumima HT grupe bile slabije klasterovane. Uzorci bogati Ni (gornja desna strana dijagrama) i Se (donja desna strana dijagrama) nalazili su se van „Hotelling“-ove elipse 95%-tnog intervala pouzdanosti i njihove vrednosti koncentracija se moraju uzeti sa rezervom. Može se izvesti zaključak da PLS-DA metoda ima veliki značaj u tačnoj predikciji postojanja HT-a na osnovu koncentracija metala u ispitivanim uzorcima seruma.

Kako je HT najzastupljeniji uzročnik hipotiroidizma, koncentracija esencijalnih metala u serumu pacijenata sa HT-om i/ili hipotiroidizmom prijavljena je od strane velikog broja studija, ali je između studija zabeležena velika kontradiktornost u rezultatima, posebno za Cu, Zn i Se [124-126]. Jedino slaganje odnosi se na hipermanganemiju kod pacijenata sa nelečenim oblikom HT-a. Nivo Cu, Zn i Se kod eutiroidnih pacijenata pre i posle terapije sa levotiroksinom (LT4) ispitali su Erdal i sar. [127] i Przybylik-Mazurek i sar. [128]. Obe studije utvrdile su da se nivo esencijalnih metala u plazmi značajno ne menja pre i nakon terapije sa sintetičkim T4 (LT4), koji se daje pacijentima sa hipotiroidizmom da se nadoknadi izgubljena količina endogenog tiroksina. U tom smislu, naši rezultati o povećanoj koncentraciji metala u serumu eutiroidnih pacijenata sa HT-om mogli bi da ukažu na deregulisani sadržaj metala i pruže jedinstveni profil devet metala kod eutiroidnih pacijenata sa Hašimotovim tiroiditisom.

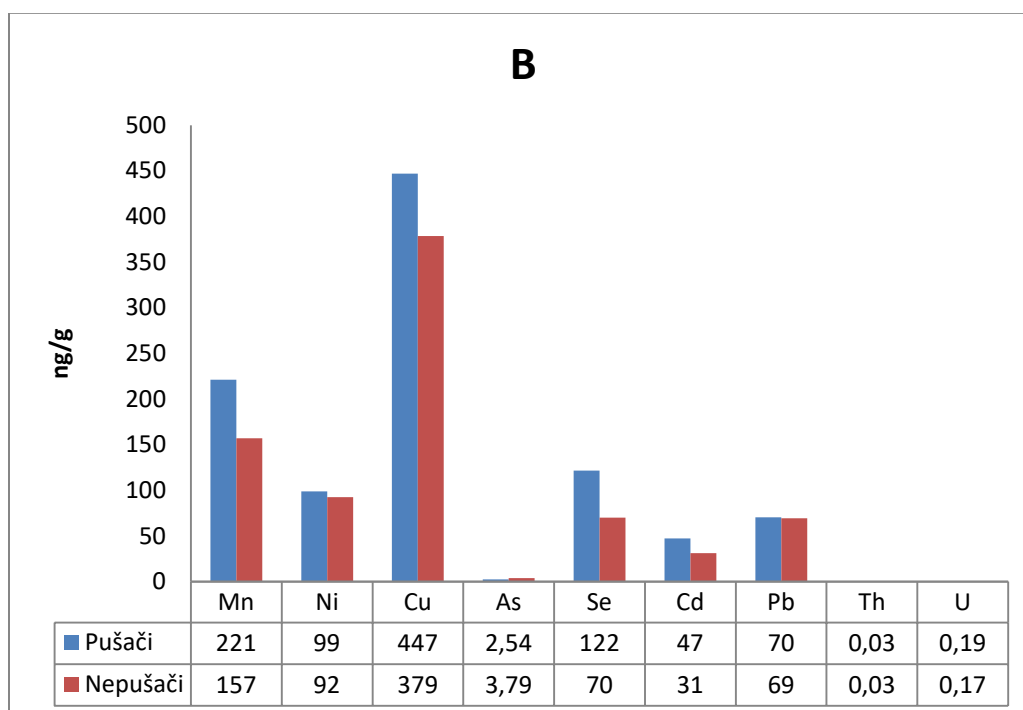
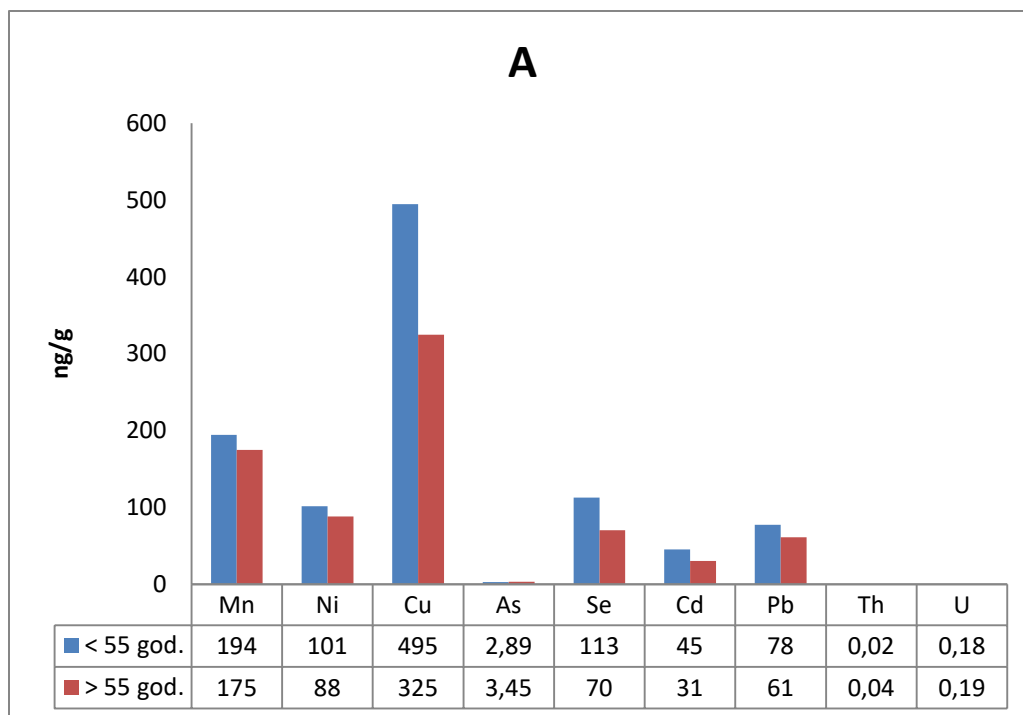


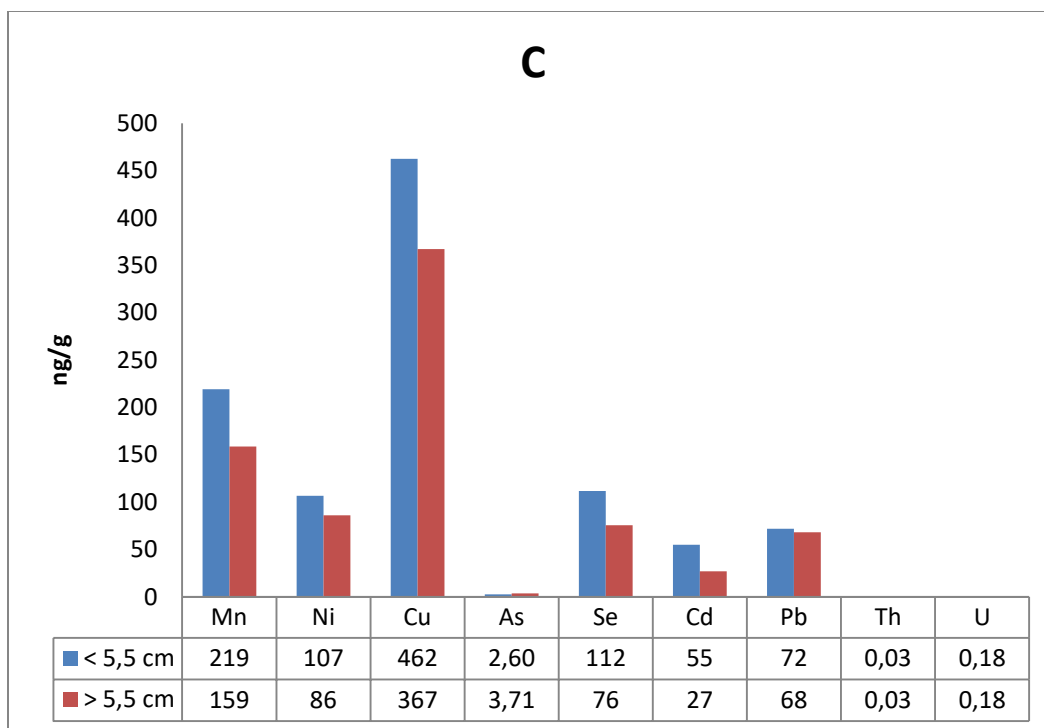
Slika 26. PLS-DA model za dve grupe uzoraka seruma.

Sadržaj esencijalnih i toksičnih metala kvantifikovan je u tkivnom materijalu pacijenata sa HT-om. Osnovni podaci o ispitanicima dati su u Tabeli 8 i grafički prikaz GM vrednosti za sadržaje metala (izuzev za cink) prikazan je na Slici 27. Izuzetak je bio pol ispitanika, jer nijedan pacijent nije bio muškarac, a što odgovara izuzetno niskoj učestalosti oboljevanja u odnosu na žene. Razlika u sadržaju metala između dve grupe potvrđena je sa *Mann-Whitney U* testom. Naši rezultati ukazuju da je jedino sadržaj Cu bio značajno povećan u mlađoj grupi pacijenata (539 ± 248 ng/g) kada se upoređi sa starijom grupom pacijenata (351 ± 142 ng/g). Kadmijum je bio značajan za razdvajanje pušača (59 ± 40 ng/g) od nepušača (41 ± 32 ng/g), kao i za razdvajanje nodusa većeg prečnika (68 ± 43 ng/g) od nodusa manjeg prečnika (33 ± 20 ng/g) ($p < 0,05$).

Tabela 8. Osnovni podaci o ispitanicima sa Hašimotovim tiroiditisom.

	Pol		Uzrast (godine)		Pušački status		Veličina nodusa (cm)	
	Žene	Muškarci	< 50	> 50	Da	Ne	< 5,5	> 5,5
Broj pacijenata	21	-	10	11	9	12	10	11





Slika 26. Distribucija sadržaja metala na osnovu A) pola, B) pušenja i C) veličine nodusa.

Parametri deskriptivne statistike za sadržaj metala u HT-u i kontrolnoj grupi dati su u Tabeli 9. Dobijen je značajno veći sadržaj Mn, Cu, As, Se, Pb i U u tkivu pacijenata sa HT-om. Interesantno je da je sadržaj Th bio značajno veći u kontrolnoj grupi. Sadržaj Ni i Zn nije bio od značaja za razdvajanje dve ispitivane grupe (Slika 28).

Table 9. Parametri deskriptivne statistike za sadržaj metala u tkivima sa HT-om i kontrolnoj grupi (ng/g).

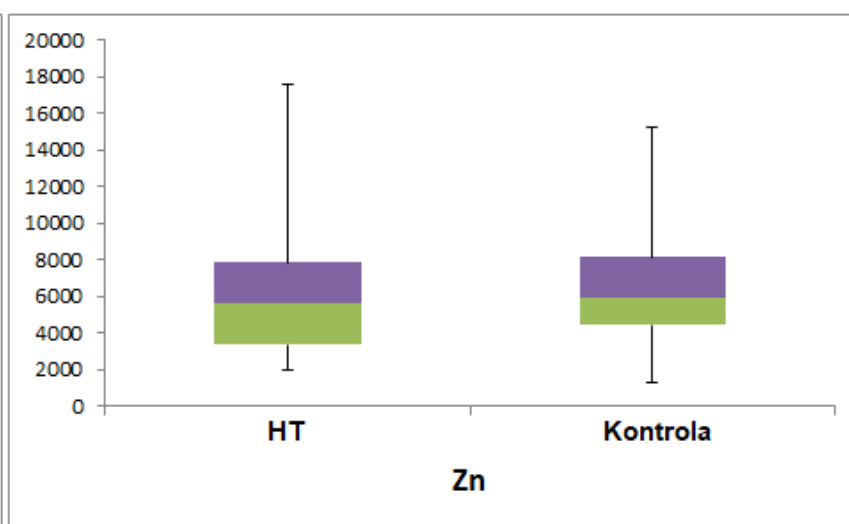
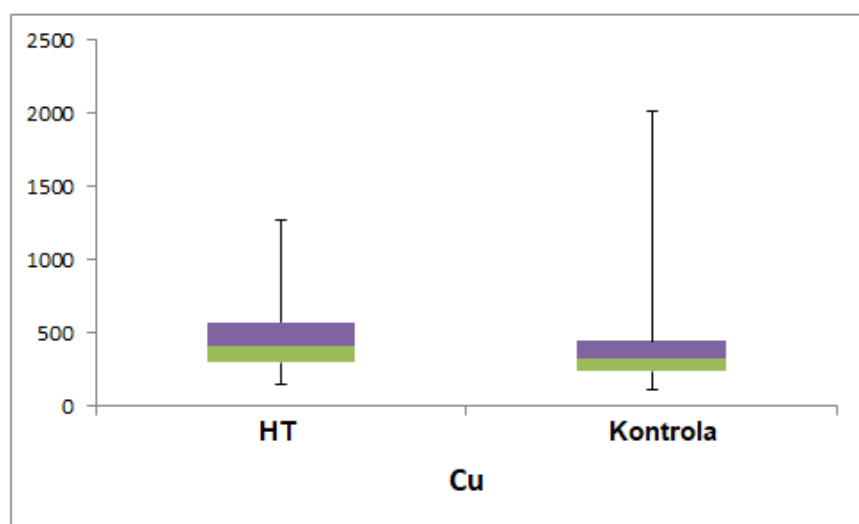
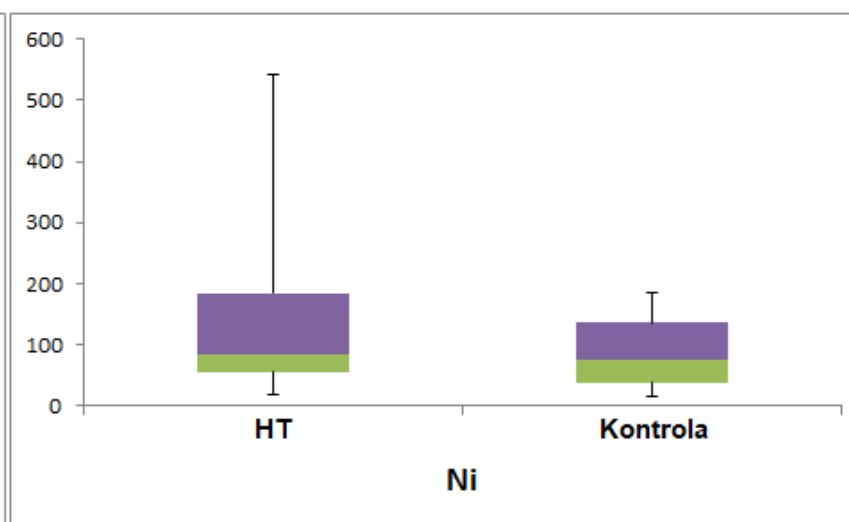
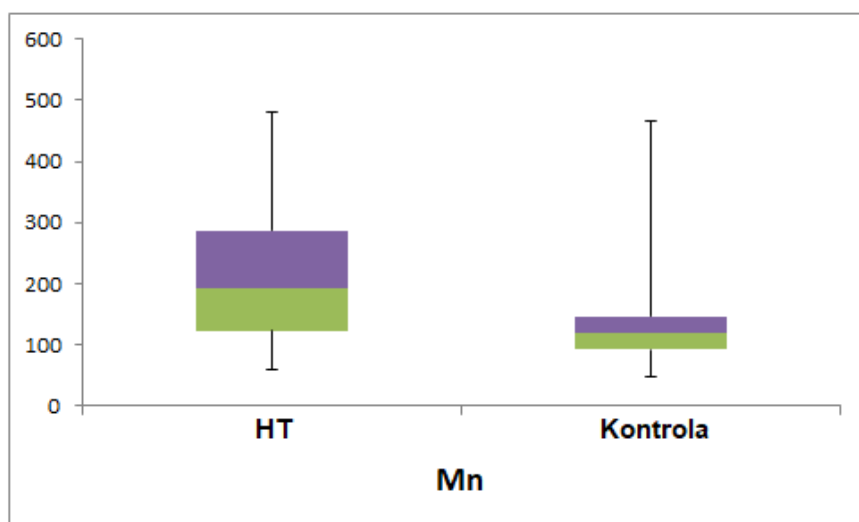
		Mn	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U
Hašimotov tiroiditis	medijana	192	84	415	5593	3,07	104	40	51	0,02	0,20
	IQR	164	55	272	4462	7,19	93	50	50	0,05	0,09
	min	59	18	151	1946	0,37	37	11	10	0,01	0,07
	max	482	443	1272	17601	14,4	217	138	116	0,20	0,48
Kontrolna grupa	medijana	120	75	329	5896	0,89	122	40	33	0,20	0,05
	IQR	77	50	209	4152	0,76	115	50	40	0,19	0,16
	min	30	15	108	1319	0,07	26	2,42	5,01	0,01	0,01
	max	404	186	2018	11383	4,38	496	128	106	0,97	0,46
U-test	p-vred.	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05

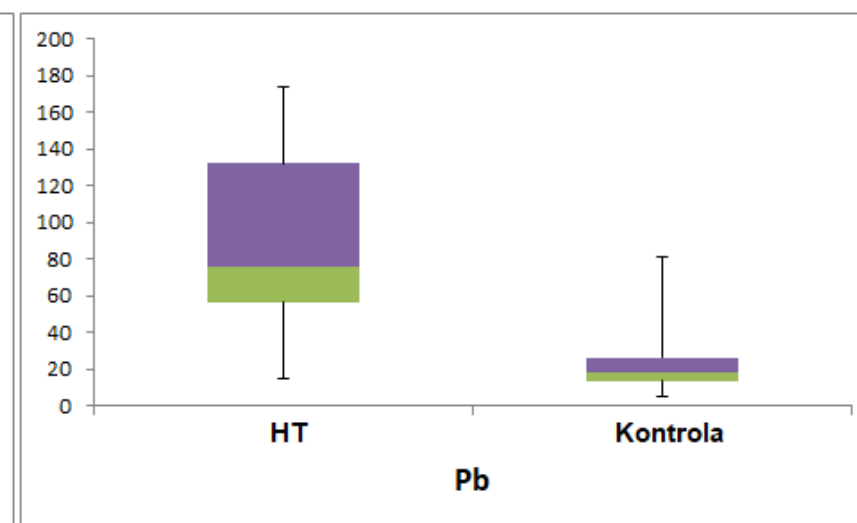
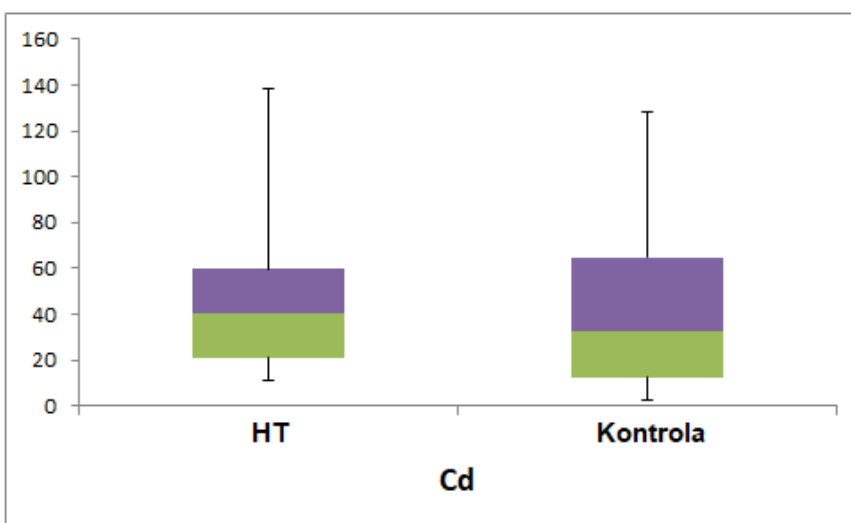
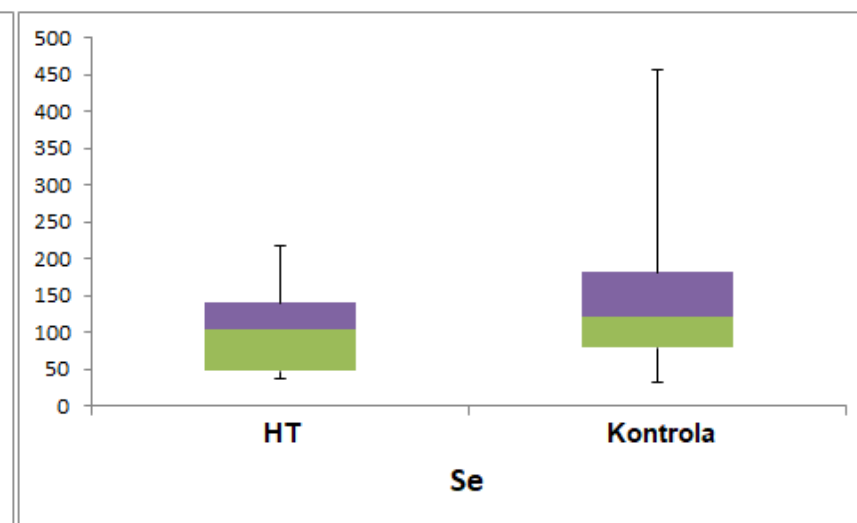
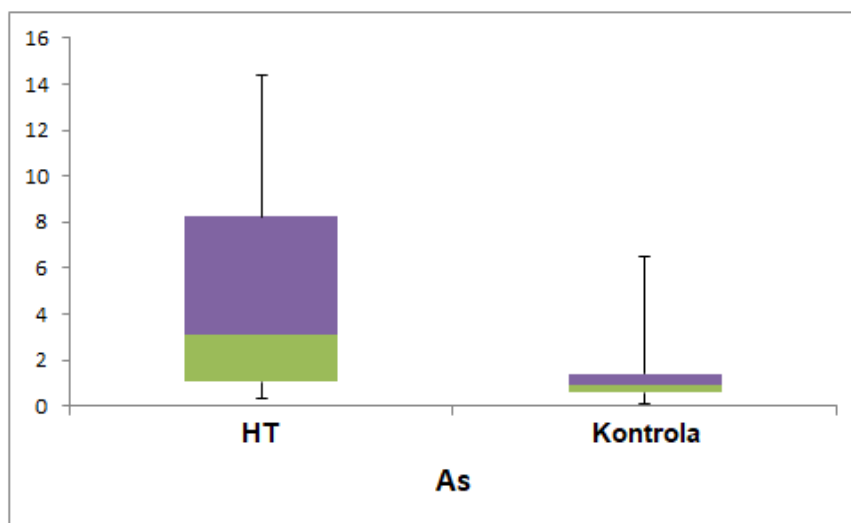
Kako je ovo prvo istraživanje koje je prijavilo sadržaj metala u tkivima pacijenata sa HT-om, komparativnu analizu sa drugim studijama nije moguće sprovesti.

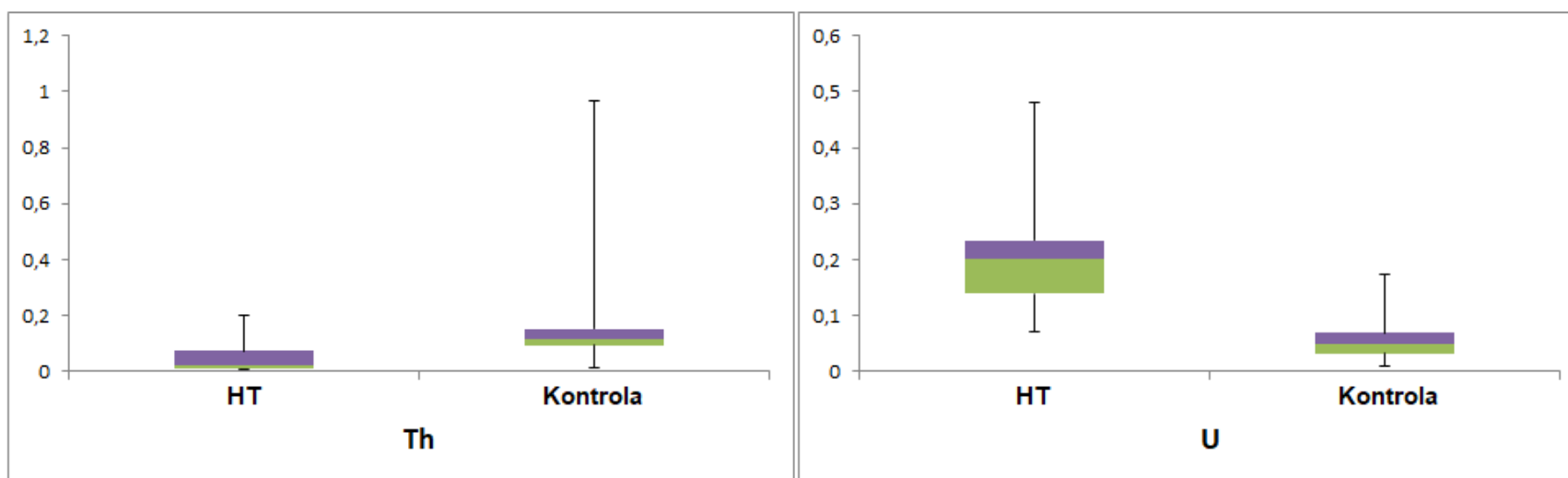
Najznačajniji toksični metal koji je razdvojio tkiva sa HT-om od kontrole bio je arsen. Glavni način unosa arsena za neprofesionalno izloženu populaciju je pijaća voda i maksimalno dozvoljena koncentracija arsena u pijaćoj vodi je 10 µg/L [129,130]. U revijalnom radu Singh-a i sar. [129] istaknuta je ozbiljna kontaminacija pijaće vode sa neorganskim oblicima arsena širom sveta, posebno u Bangladešu, Indiji, Čileu, Tajlandu, Tajvanu, Rumuniji, Mađarskoj itd. Najveća koncentracija arsena u pijaćoj vodi zabeležena je u Bangladešu (do 4700 µg/L) i Indiji (do 3700 µg/L). Posledično, za ove zemlje je karakteristična arsenoza (hronično trovanje arsenom).

Povećana koncentracija arsena u pijaćoj vodi zabeležena je i u Srbiji. U Srbiji se najveći broj zagađivača direktno ispušta u životnu sredinu, a prečišćavanje otpadnih voda je nedovoljno zbog nedostatka finansijskih i tehničkih sredstava za uklanjanje teških metala [131]. Jovanović i sar. [132] zabeležili su najveću koncentraciju arsena u pijaćoj vodi u Vojvodini, prvenstveno u Banatskom okrugu i Zrenjaninu. Stanisavljev i sar. [133] odredili su da je koncentracija arsena u pijaćoj vodi u Zrenjaninu i još nekim okolnim mestima bila i do 10 puta veća od dozvoljenog nivoa i da je u pojedinim uzorcima dostizala vrednost od 300 µg/L. Dević i sar. [134] zabeležili su povećane vrednosti arsena u pijaćoj vodi Banatskog okruga (26-138 µg/L) i Velike Morave (21,7 µg/L) i istakli da je dobar deo srpske populacije hronično izložen arsenu.

Značajno povećan sadržaj arsena u tkivu pacijenata sa Hašimotovim tiroiditisom mogao bi da se objasni hroničnom izlaganju arsenu preko pijaće vode, a mehanizam njegovog toksičnog dejstva na tiroidno tkivo mogao bi da se objasni heliranjem za tiroidne proteine, što za posledicu ima izmenu topologije *self*-proteina i stvaranje novih antigena, koji trigeruju autoimuni odgovor. Da bi se ova hipoteza proverila, u budućnosti je neophodno izvršiti analizu uticaja demografske distribucije sadržaja arsena u odnosu na poreklo obolelih.







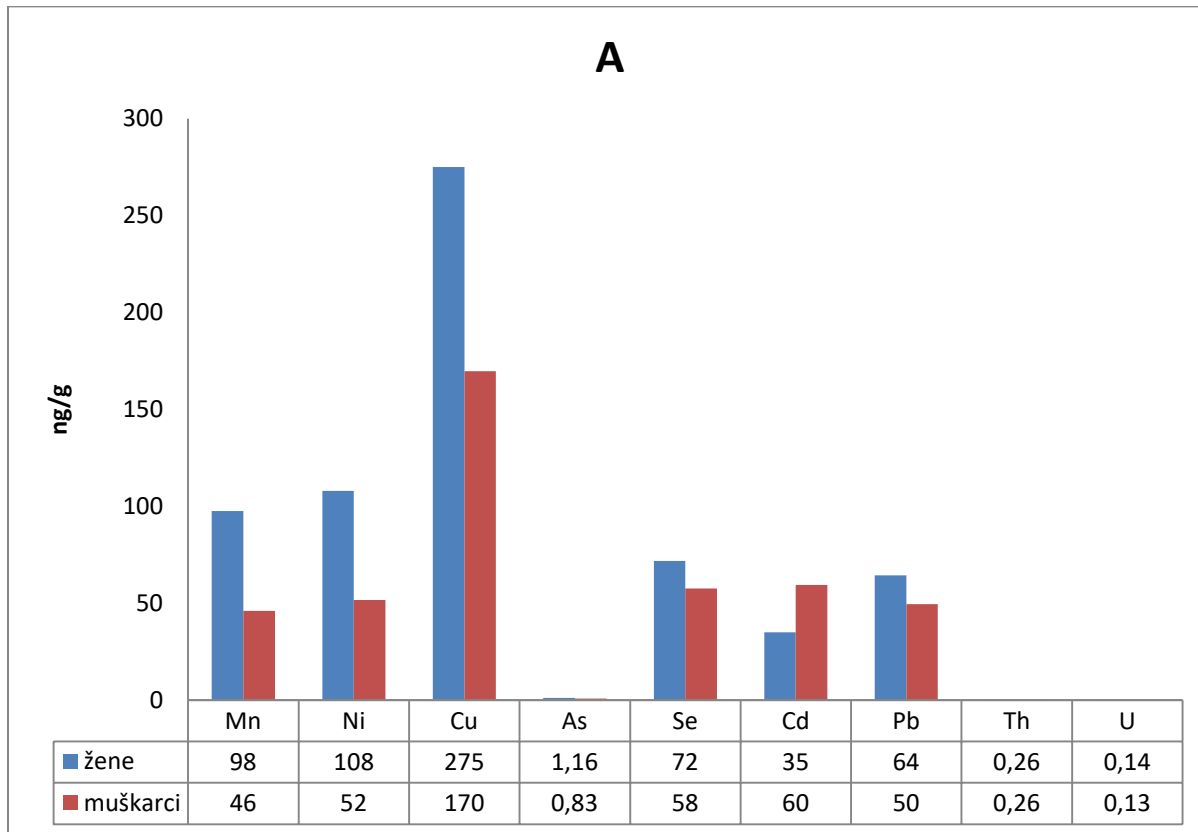
Slika 28. Box plotovi za sadržaj metala u tkivu pacijenata sa HT-om i kontrolnoj grupi (ng/g).

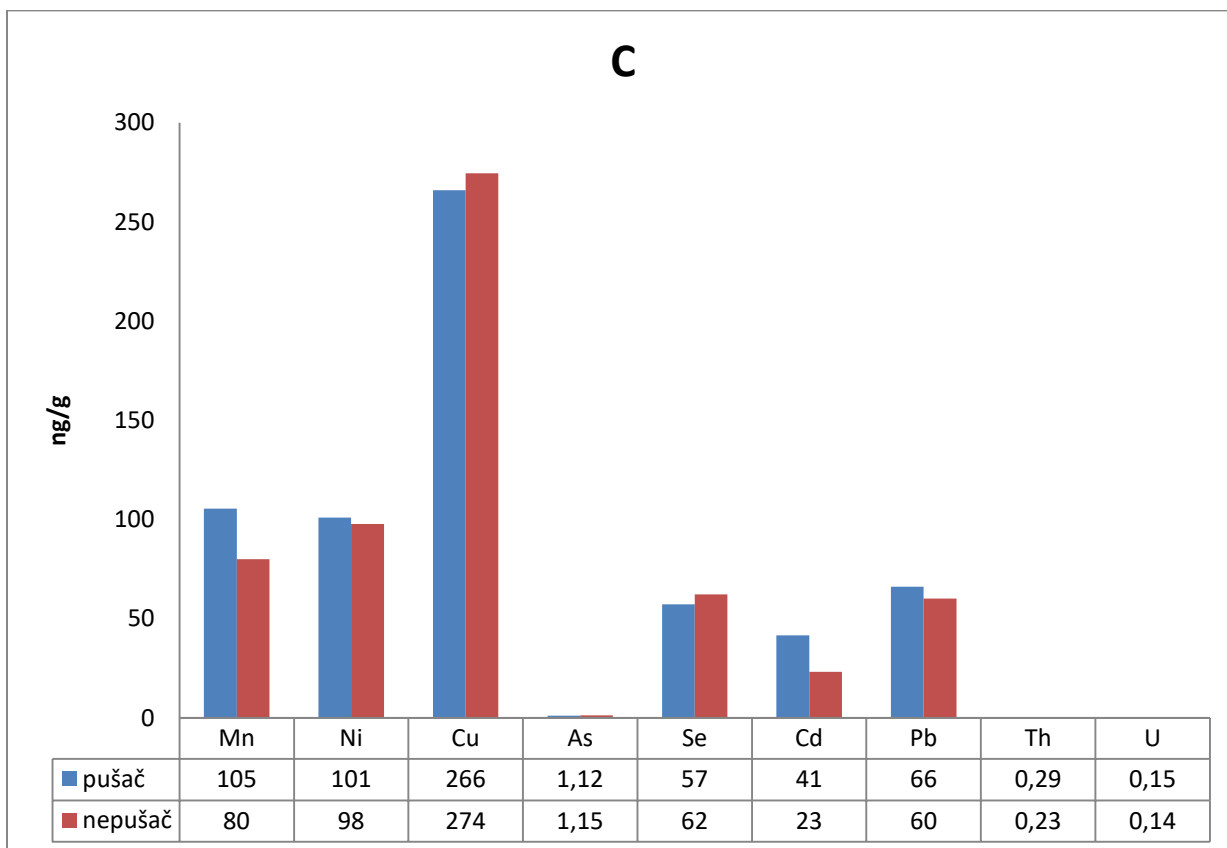
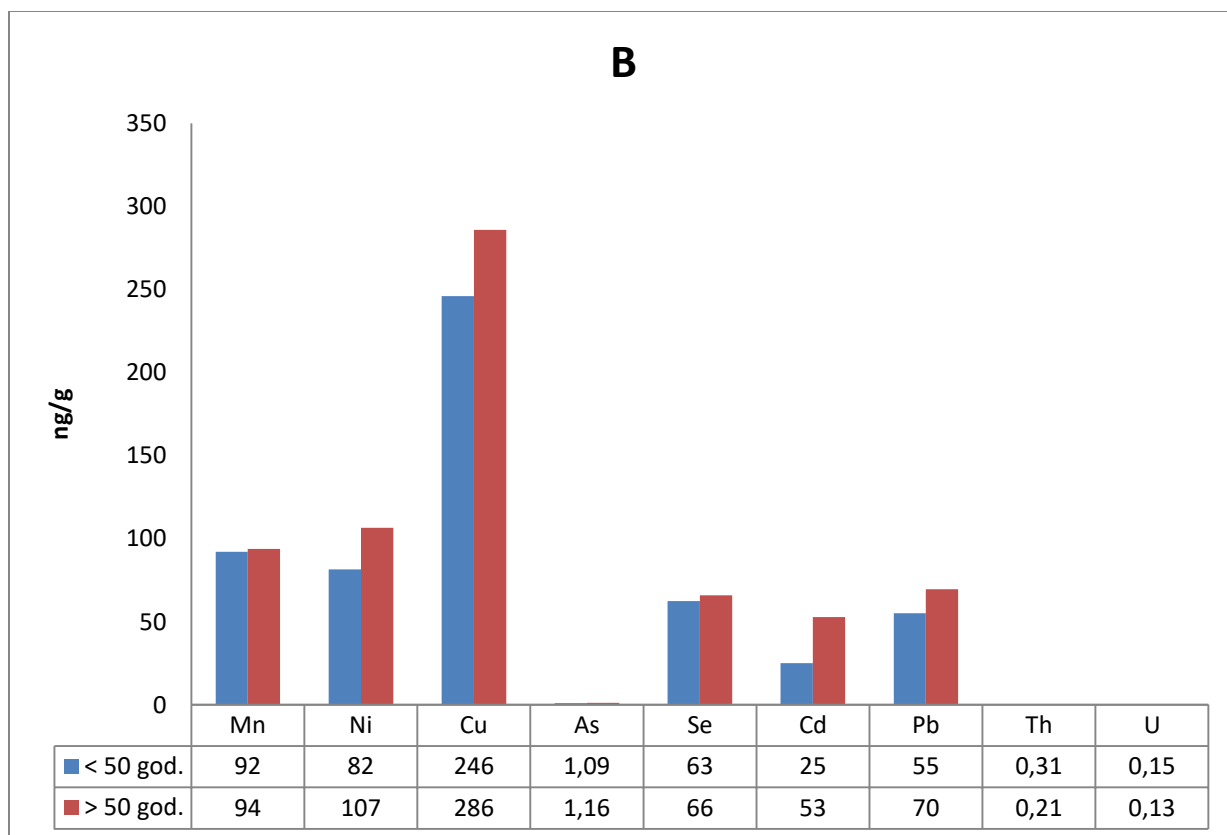
4.3. Koloidne strume

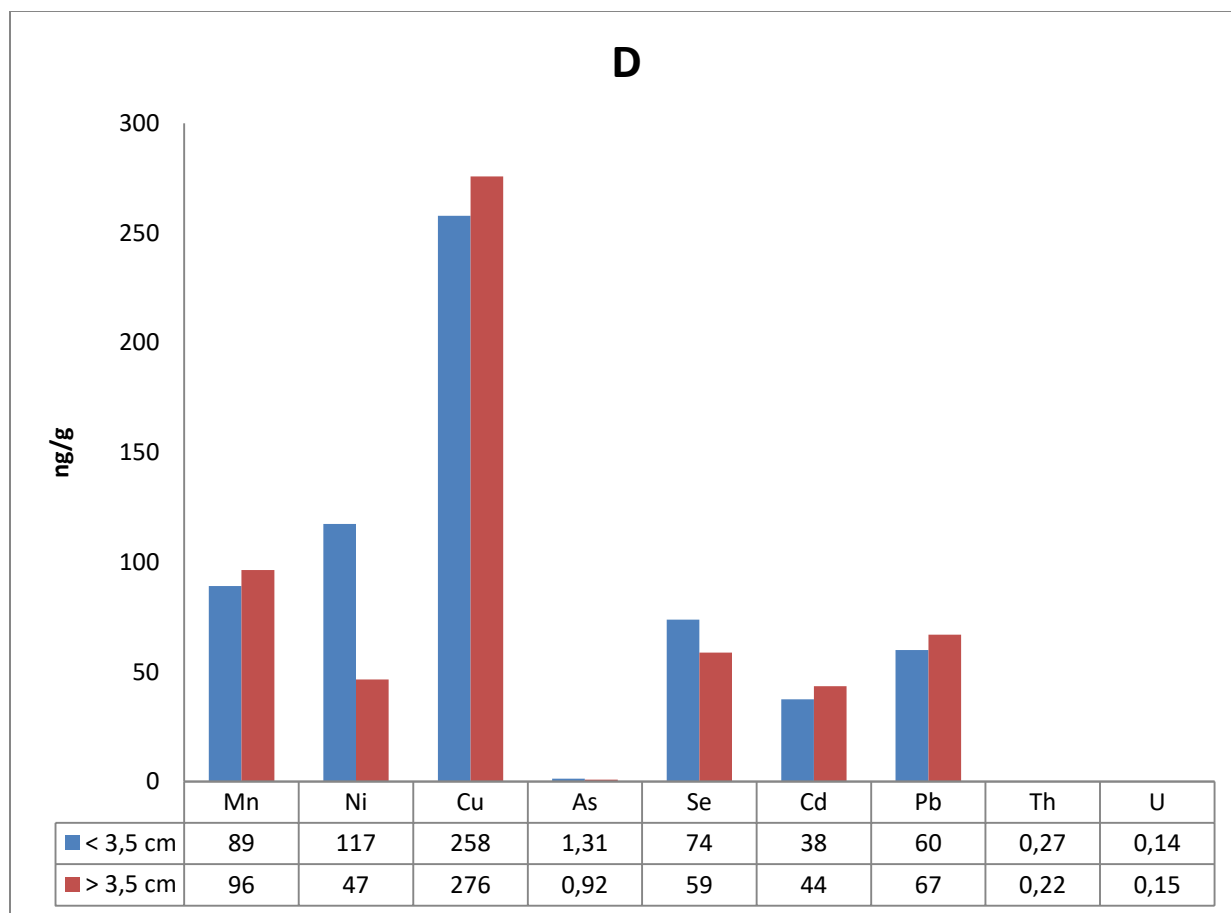
Uzorci tiroidnog tkiva sakupljeni su od 62 pacijenta sa koloidnom strumom (KS). Podaci o ispitanicima dati su u Tabeli 10. Grafička distribucija sadržaja metala (izuzev za Zn) na osnovu GM vrednosti prikazana je na Slici 29. Poređenje između grupa ispitano je sa *Mann Whitney U* testom. U poređenju sa muškarcima, žene su imale značajno povećan sadržaj Mn, Ni i Cu, dok su muškarci imali značajno povećan sadržaj Cd. Povećan sadržaj Cd i smanjen sadržaj Zn bio je od značaja za razdvajanje starijih pacijenata od mlađih, dok se sadržaj metala u tkivima pušača i nepušača nije značajno razlikovao. Na osnovu veličine nodusa, jedino je sadržaj Ni bio značajno povećan u nodusima manjem prečnika, što je značajan podatak sa aspekta posmatranja nikla kao potencijalnog inicijatora patogeneze koloidne strume.

Tabela 10. Osnovni podaci o pacijentima sa koloidnom strumom.

	Pol		Uzrast (godine)		Pušački status		Veličina nodusa (cm)	
	Žene	Muškarci	< 50	> 50	Da	Ne	< 5,5	> 5,5
Broj pacijenata	49	13	25	37	51	11	27	35





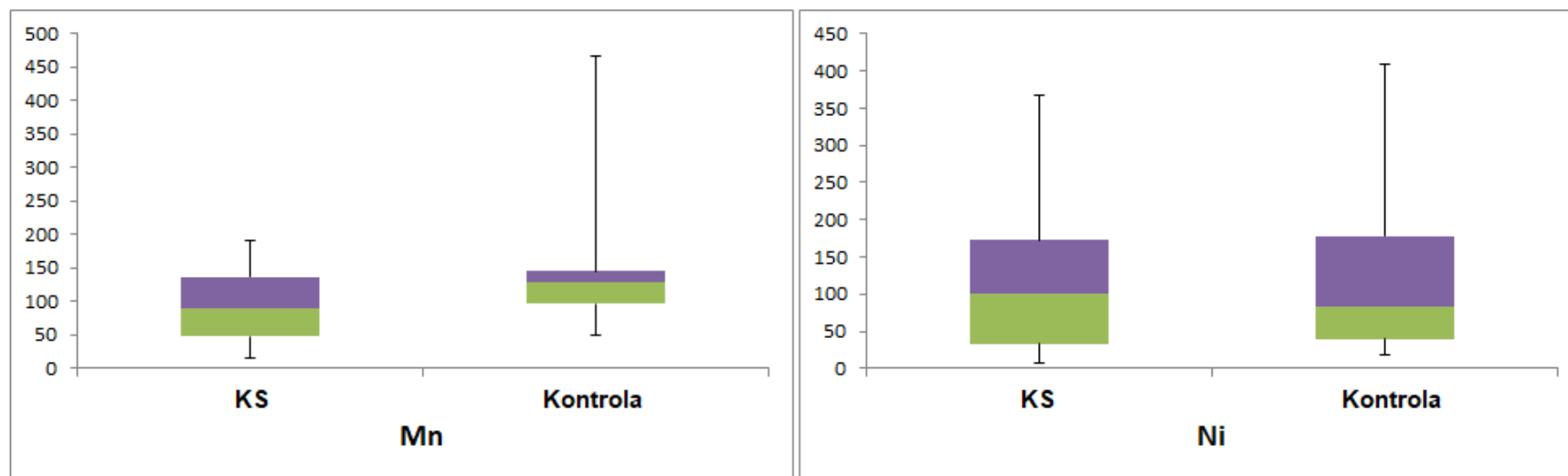


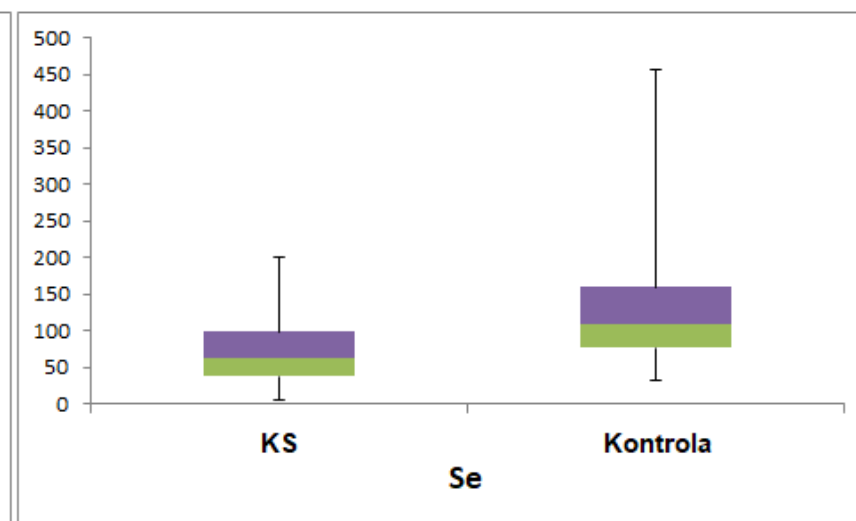
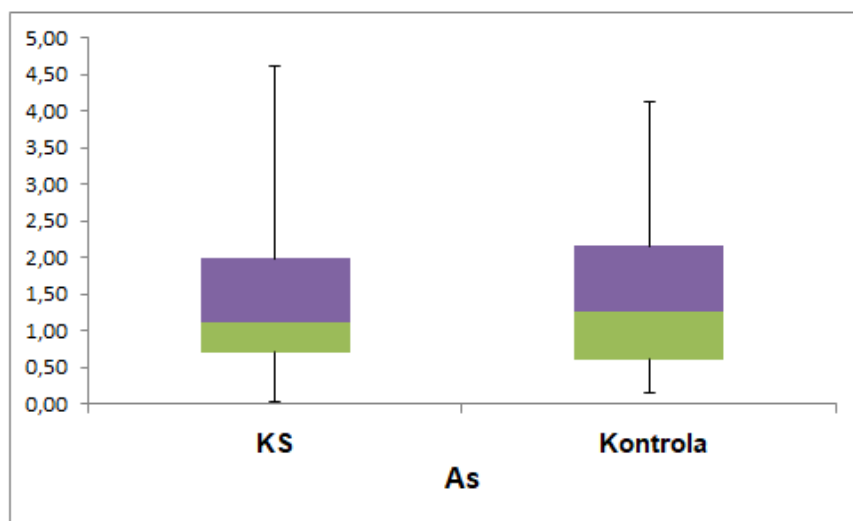
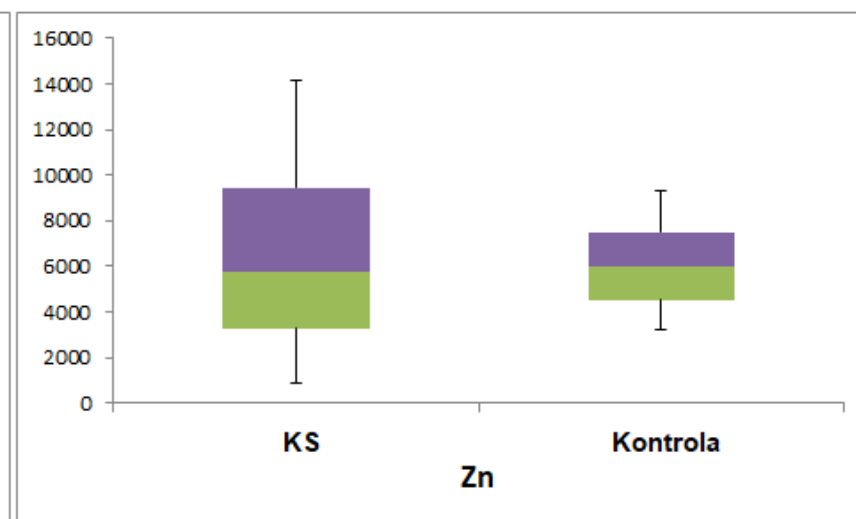
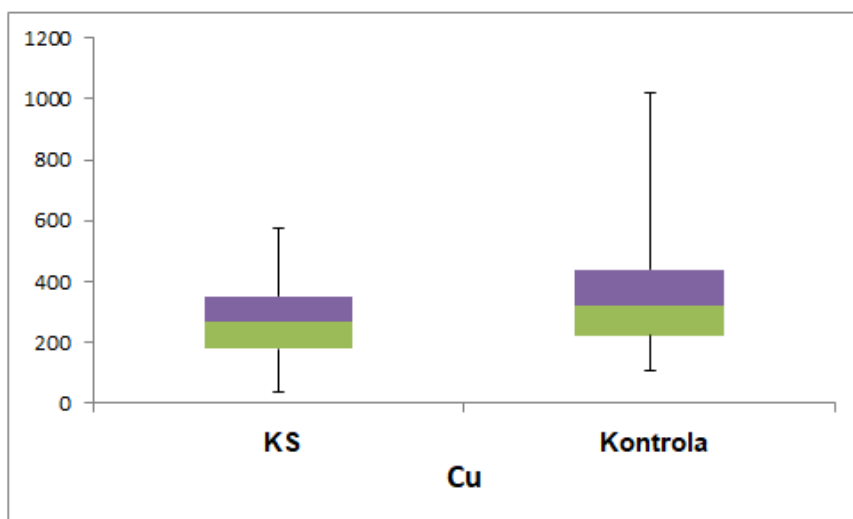
Slika 29. Distribucija sadržaja metala na osnovu A) pola, B) uzrasta, C) konzumiranja duvana i D) veličine nodusa.

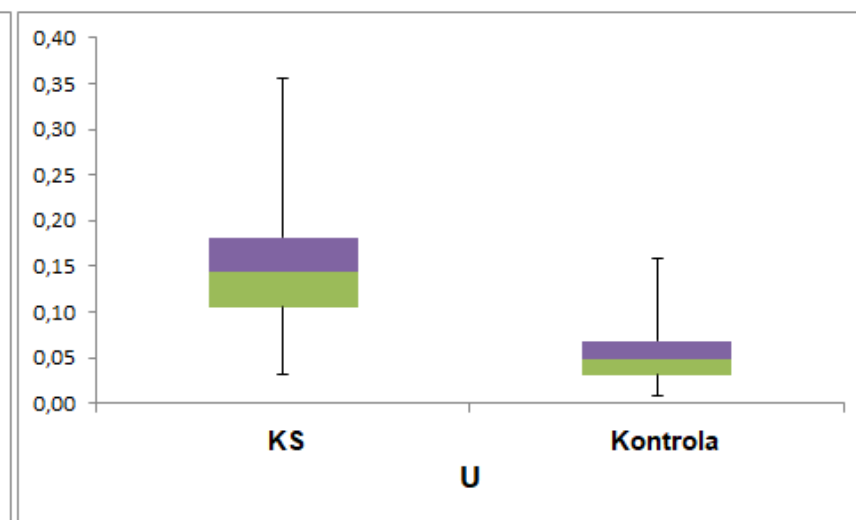
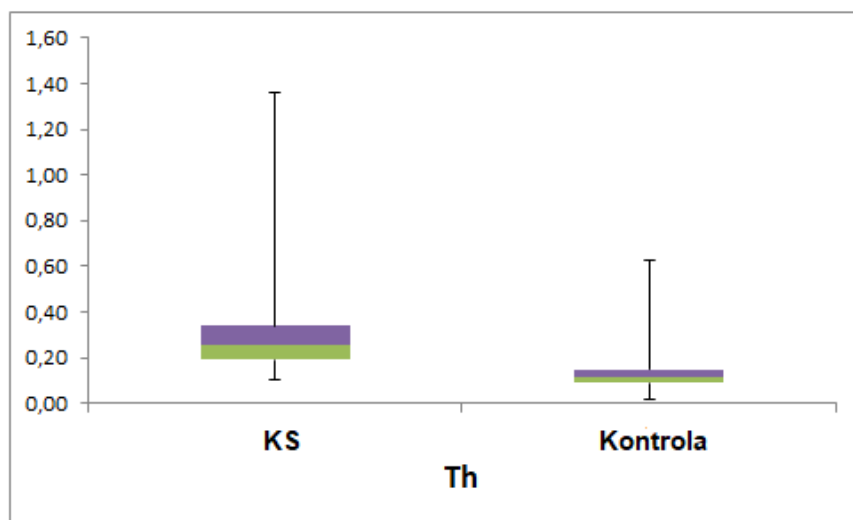
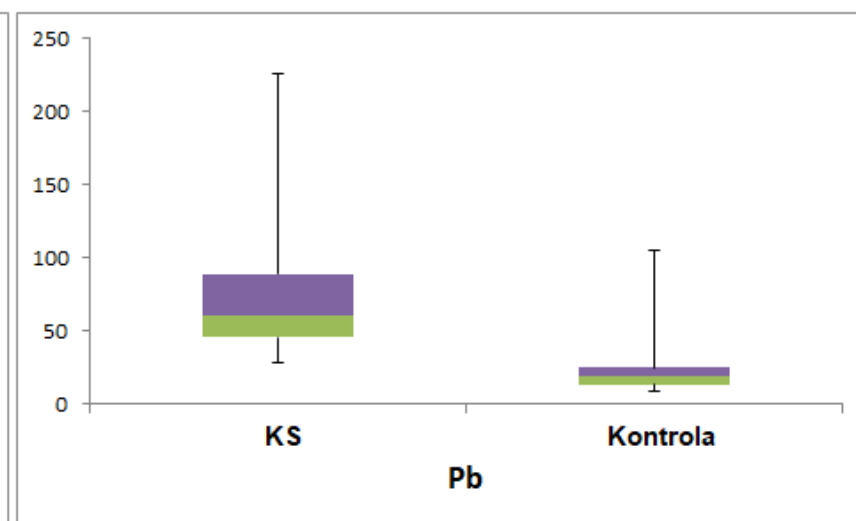
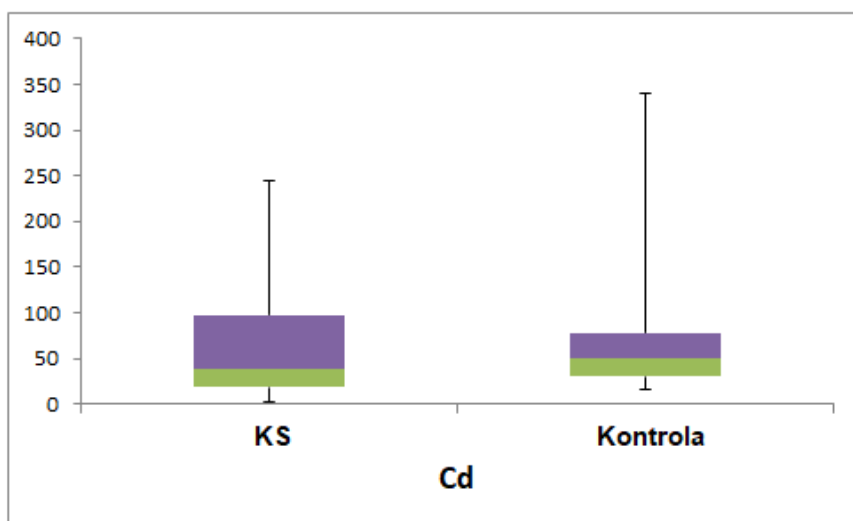
Parametri deskriptivne statistike za sadržaj metala i izabrane odnose dati su u Tabeli 11. Kontrolna grupa je obrazovana od ZTT i jednog seta uzoraka zdravih tkiva pacijenata sa KS, koji se po sadržaju metala nije značajno razlikovao u odnosu na ZTT ($p > 0,05$). Poređenje kontrolne grupe sa KS tkivima prikazano je na Slici 30. Zbog značajnog odstupanja rezultata od normalne distribucije, razlika u sadržaju metala potvrđena je sa *Mann-Whitney U* testom. Sadržaj Mn i Se bio je značajno smanjen u uzorcima tkiva sa KS, dok je sadržaj Pb, Th i U bio značajno povećan ($p < 0,05$).

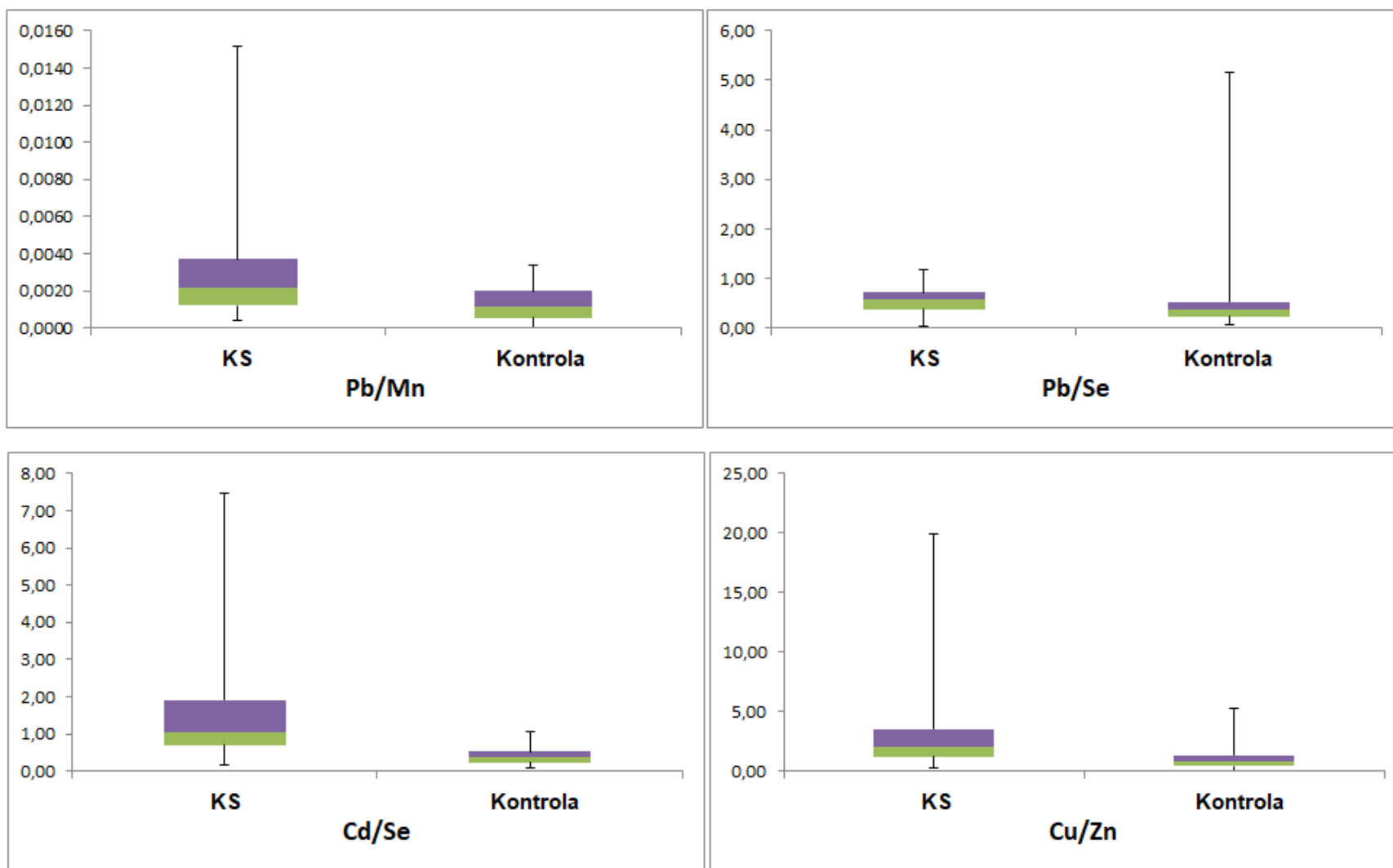
Tabela 11. Parametri deskriptivne statistike za sadržaj metala u koloidnim strumama i kontrolnim tkivima (ng/g).

		Mn	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Pb/Mn	Pb/Se	Cd/Se	Cd/Mn	Cu/Zn
Koloidne strume	medijana	90	101	271	5797	1.1	62	39	61	0.26	0.14	0.88	1.06	0.71	0.72	0.04
	min	16	7	37	900	0.04	6	2	29	0.11	0.03	0.17	0.17	0.11	0.03	0.02
	max	191	367	574	14159	4.6	200	245	226	1.36	0.36	3.95	7.13	5.28	2.23	0.18
	IQR	89	139	173	6180	1.3	61	80	43	0.15	0.07	0.86	1.13	0.70	1.05	0.05
Kontrolna grupa	medijana	128	82	319	5969	1.3	109	50	19	0.11	0.05	0.16	0.18	0.43	0.37	0.05
	min	49	18	108	3220	0.2	32	16	8	0.02	0.01	0.04	0.04	0.08	0.07	0.02
	max	466	408	1018	9333	4.1	458	340	106	0.63	0.16	0.82	1.12	2.22	3.68	0.16
	IQR	48	138	217	2984	1.5	83	48	11	0.06	0.04	0.12	0.24	0.83	0.58	0.03
U-test	<i>p</i> -vred.	<0.05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0.05	>0,05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0,05	>0,05	>0,05



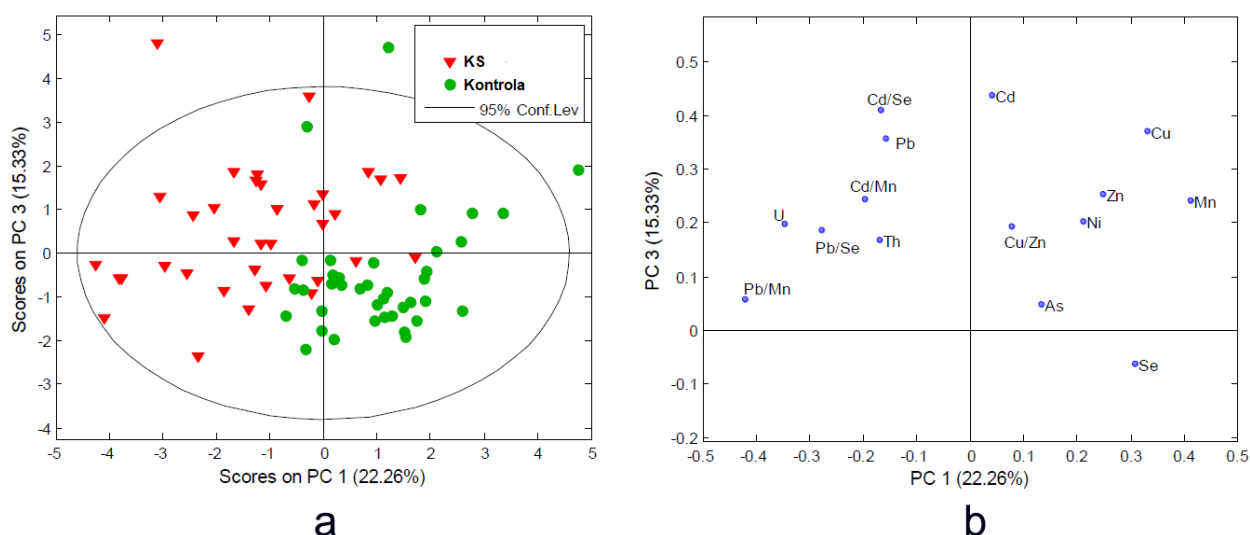






Slika 30. Box-plotovi za sadržaj metala i izbrane odnose metala između dve grupe (u ng/g).

PCA je primenjena u cilju uspostavljanja pouzdanijih kriterijuma za razdvajanje uzoraka dve grupe koji su se poklapali po biološkim parametrima. Dobijen je petokomponentni model koji objašnjava 75,37% ukupnog varijabiliteta podataka. Projekcije faktora skorova i latentnih koeficijenata varijabli vektora za prvu i treću komponentu prikazane su na Slici 31. Na Slici 31a uočavaju se dve jasno razdvojene grupe uzoraka duž PC1 smeru. Najuticajniji parametri koji su razdvojili uzorke KS od kontrole bili su esencijalni elementi, Mn i Se, sa povećanim sadržajem u kontroli, dok su povećani sadržaji U, Pb/Mn i Pb/Se razdvojili KS (Slika 31b). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa U-testom.



Slika 31. PCA model za diferencijaciju sadržaja metala i izabranih odnosa u dve ispitivane grupe.

Status klinički-značajnih metala u tkivu pacijenata sa koloidnom strumom nedovoljno je ispitan, a zbog sve češće pojave neophodno je bolja metalomska karakterizacija koloidne strume. Metalomika koloidne strume zavisi od tipa analiziranog tiroidnog čvora (difuzna hiperplastična koloidna struma, nodularna, multinodularna), što je ujedno glavno objašnjenje za neusaglašenost prijavljenih rezultata među studijama. S druge strane, razlike u životnim navikama takođe treba uzeti u obzir prilikom tumačenja rezultata.

Blazewicz i sar. [51] odredili su sadržaj metala u reprezentativnom broju uzoraka tkiva sa nodularnom strumom ($n = 115$) i utvrdili da je koncentracija Cu, Mn i Zn bila značajno smanjena u obolelim tkivima. Interesantno je da je koncentracija Zn bila duplo veća u zdravim tkivima i da u istim uzorcima nisu detektovali Ni i Cd. Ovi rezultati su u potpunoj suprotnosti sa našim, sa izuzetkom smanjenog sadržaja Mn u uzorcima KS. Soldin i Aschner [136] pokazali su da Mn

može da utiče na poremećaj u regulaciji dejodinaznih enzima i da na taj način ometa homeostazu tiroidnih hormona. Giray i sar. [137] istakli su da deregulisan sadržaj metala može da dovede do razvoja gušavosti. Kucharzewski i sar. [105] su prvo zabeležili smanjen sadržaj Se u nodularnoj strumi, a godinu dana kasnije su istakli da je sadržaj Zn takođe bio značajno veći kod žena sa nodularnom strumom u odnosu na kontrolnu grupu [138]. Njihovi rezultati su u saglasnosti sa našim, s tom razlikom što razlike za oba metala nisu bile značajne na $p < 0,05$. Oni su takođe pronašli da je sadržaj Cu/Zn snižen u koloidnim nodusima. Naši rezultati mogu da podrže njihove podatke i dodatno ukazuju da odnos Cu/Zn značajno opada u mlađoj grupi ispitanika. Smanjen sadržaj esencijalnih metala (Cu, Mn i Zn) u tkivima KS stvara uslove za neadekvatnu aktivnost SOD, koja predstavlja prvu liniju odbrane od slobodnih kiseoničnih radikala, kojima tiroidno tkivo izuzetno obiluje.

Najznačajniji metal koji je razdvojio uzorke koloidne strume od kontrole je Pb. Olovo je dobro poznati toksikant za životnu sredinu [139] i glavni putevi unosa olova su zagađeni vazduh, hrana, cigarete i pijaća voda [140-145]. Zagađenje vazduha olovom može se izbeći uklanjanjem olova iz benzina i kontrolisanjem industrijske emisije [146-148]. Nivo Pb u vazduhu značajno je smanjen u Srbiji nakon uklanjanja tetraetil olova iz benzina krajem 80-tih godina prošlog veka [145]. Zabeleženi sadržaj Pb u cigaretama na teritoriji Srbije iznosio je $0,53 \mu\text{g/g}$, što je značajno niža vrednost kada se uporedi sa drugim zemljama [149]. S obzirom da olovo nije igralo ključnu ulogu u razdvajanju uzoraka KS kod pušača i nepušača, mogao bi se izvesti zaključak da je njegov efekat na patogenezu ove bolesti pri unosu duvana od manjeg značaja. Škrbić i sar. [150] analizirali su sadržaj olova u različitim namirnicama i ukazali su da je sadržaj Pb u saglasnosti sa važećim zakonodavstvom Srbije. Međutim, glavni problem u Srbiji predstavljaju zagađene pijaće vode sa olovom i drugim teškim metalima. Jedan od najboljih primera je zagađenje reke Save, koja se koristi za javno vodosnabdevanje velike teritorije Srbije. Borković-Mitić i sar. [131] su utvrdili da je 2006. godine koncentracija Pb u vodi prešla maksimalno dozvoljenu koncentraciju od 1 g/L , posebno u Ostružnici, gde je koncentracija Pb bila iznad 5 g/L . Sakan i sar. [151] su pronašli najveći stepen zagađenja Pb u pijaćoj vodi Kruševca ($15,8 \mu\text{g/L}$), zbog nekontrolisanog ispuštanja olova i drugih teških metala iz antropogenih izvora.

Mehanizam toksičnih efekata Pb na folikularne ćelije nije dovoljno ispitan. Utvrđeno je da olovo negativno utiče na tiroidnu homeostazu povećavajući lučenje TSH [152]. Savchenko i Toupeleev [153] su zabeležili povećanu koncentraciju olova u punoj krvi pacijenata sa difuznom

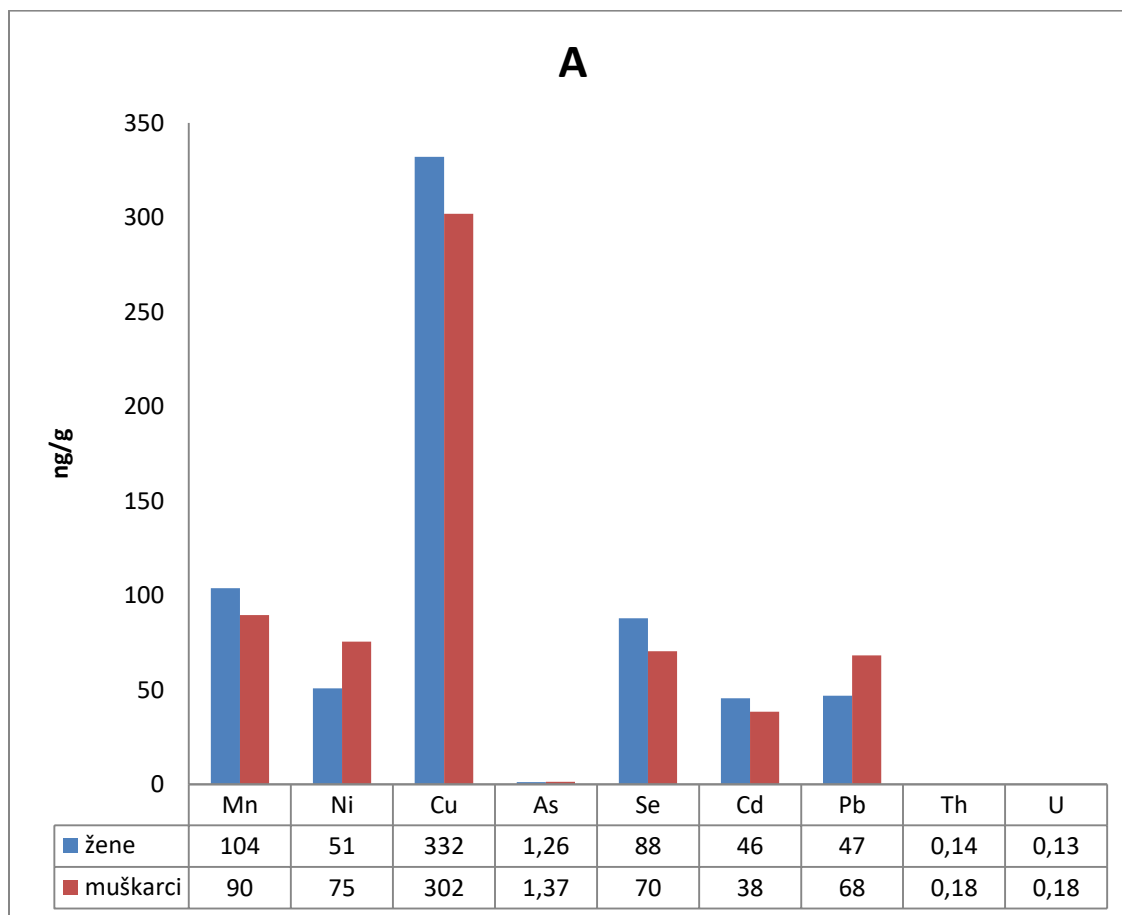
strumom. Ako se uzme u obzir da su tiroidne bolesti zabeležene kod radnika koji su bili izloženi olovu [154] i da se disfunkcija folikularnih ćelija može javiti kao rezultat akumulacije olova u tiroidnom tkivu [155], negativne efekte olova na štitastu žlezdu trebalo bi pažljivije razmatrati. Izgleda da negativno dejstvo olova na tiroidno tkivo nije samostalno i da se odvija preko uticaja na metabolizam selena, koji je kritičan element za sintezu tiroidnih hormona [156]. Gustafson i sar. [157] su još 1989. godine zabeležili da velike koncentracije olova smanjuju koncentraciju selena u plazmi. Naši rezultati ukazuju da je sadržaj Pb/Se bio povećan u uzorcima KS u odnosu na kontrolu. Moguće objašnjenje za smanjen sadržaj selena i povećan sadržaj olova u uzorcima KS je povećana apsorpcija olova u tankom crevu u prisustvu smanjenog sadržaja selena u hrani. Barany i sar. [158] istakli su da se apsorpcija selena smanjuje u duodenumu zbog kompleksno-vezanih selenita za olovo. Takođe, Kucharzewski i sar. [138] su ukazali da se interakcija olova sa selenom odvija spontano *in vivo* i da takav tip interakcije dovodi do inaktivacije Se sa olovom. Dobijeni rezultati ukazuju na prisustvo negativne korelacije između olova i selena u uzorcima koloidne strume ($r_s = -0,66$). Kako ovaj tip korelacije nije zabeležen u zdravim tiroidnim tkivima ($r_s = 0,22$), naši rezultati mogli bi da objasne antagonistički efekat istiskivanja selena sa olovom u uzorcima KS. Na osnovu dobijenih rezultata, akumulacija olova i deficit selena (zajedno sa Cu, Mn i Zn) mogao bi da pruži molekulsku osnovu za etiopatogenezu koloidne strume.

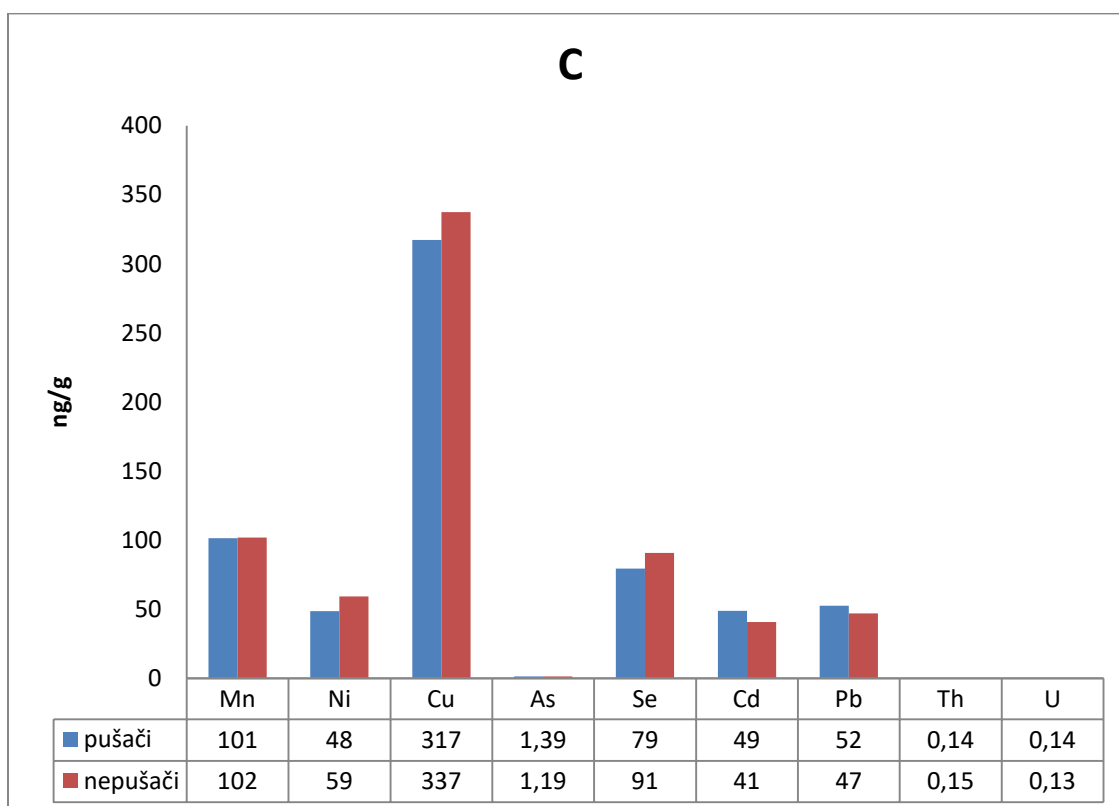
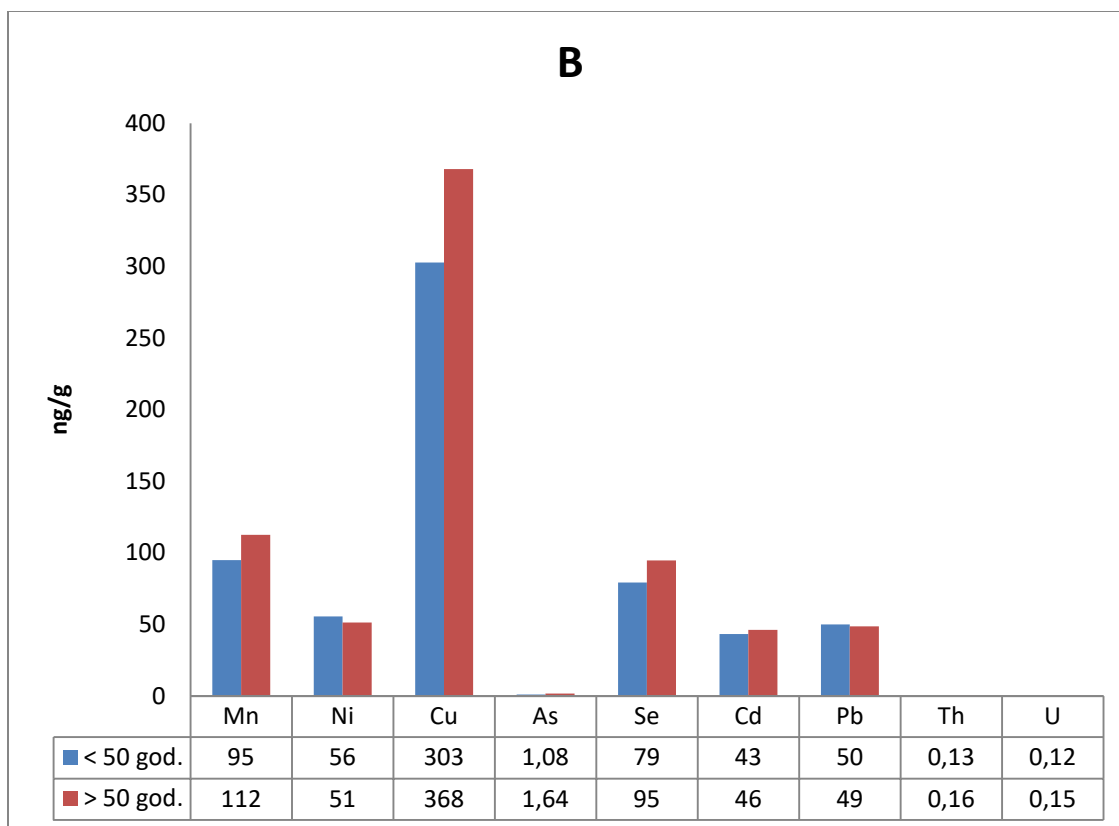
4.4. Benigni tumori (adenomi)

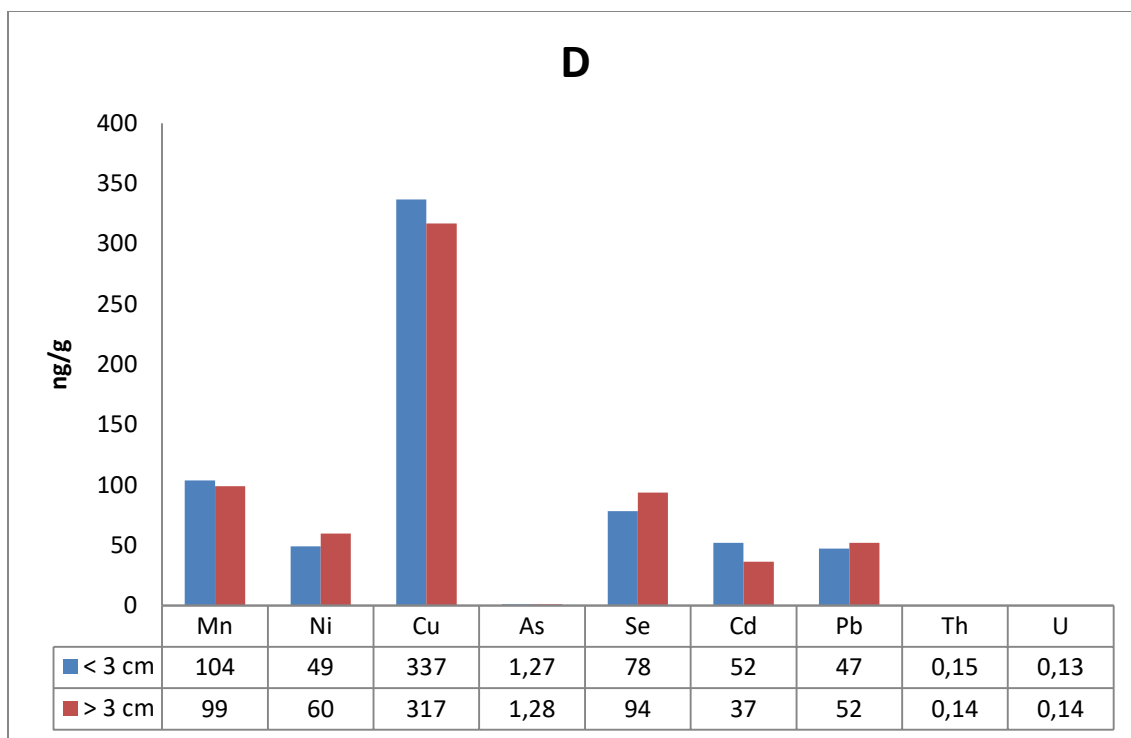
Ukupno je sakupljeno 72 tkiva, od toga 36 uzoraka tiroidnog adenoma i 36 uzoraka ZTT od 36 pacijenata. Osnovni podaci o ispitanicima dati su u Tabeli 12. Grafička raspodjela sadržaja metala (izuzev Zn) na osnovu GM vrednosti prikazana je na Slici 32. Sadržaj svih metala nije se značajno razlikovao u odnosu A) pol, B) uzrasta, C) konzumiranja duvana i D) veličine nodusa ($p > 0,05$).

Tabela 12. Podaci o ispitanicima sa tiroidnim adenomima.

	Pol		Uzrast (godine)		Pušački status		Veličina nodusa (cm)	
	Žene	Muškarci	< 50	> 50	Da	Ne	< 3	> 3
Broj pacijenata	26	10	19	17	10	26	18	18







Slika 32. Distribucija sadržaja metala na osnovu A) pola, B) uzrasta, C) konzumiranja duvana i D) veličine nodusa.

Tabela 13. Parametri deskriptivne statistike za sadržaj metala u benignim tkivima (ng/g).

		Mn	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U
Benigni tumori	medijana	100	51	314	6482	1.53	79	48	55	0,12	0.13
	IQR	64	44	190	8986	1.11	92	46	27	0,09	0.07
	min	37	37	147	2105	0.07	14	3.24	14	0,02	0.04
	max	396	395	1308	28257	5.61	452	118	119	0,92	0.67
Kontrolna grupa	medijana	119	75	337	5875	0,89	145	40	28	0,20	0,09
	IQR	77	50	209	4152	0,76	115	50	40	0,19	0,16
	min	30	15	108	1319	0,07	26	2,42	5,01	0,01	0,01
	max	404	186	2018	11383	4,38	496	128	106	0,97	0,46
U-test	p-vred.	<0,05	<0,05	<0,05	0,07	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Sadržaj metala u uzorcima benignih tkiva nije se značajno razlikovao od kontrolne grupe. Izuzetak je bio esencijalni cink, čiji je sadržaj bio povećan u tkivima benignih tumora, ali ne i statistički značajno (Tabela 13). Uloga cinka u tiroidnoj homeostazi je kompleksna i odvija se na nivou regulacije sinteze tiroidnih hormona (transkripcioni faktori koji utiču na modulaciju genske ekspresije sadrže Zn vezan za sulfhidrilne grupe). Takođe, transkripcioni faktor 2 je protein koji sadrži Zn i koji u folikularnim ćelijama interaguju sa promotorima gena za Tg i TPO [121,159].

U literaturi ne postoji dovoljno podataka o sadržaju metala u benignim tumorima štitaste žlezde. Reddy i sar. [160] pronašli su smanjenu koncentraciju Zn u tiroidnom adenomu, ali su vrednosti autora za kontrolnu grupu previsoke da bi odgovarale kontrolnim tkivima. Suprotno, a u saglasnosti sa našim rezultatima, Zaichick i sar. [102] zabeležili su smanjen sadržaj Zn u BT u poređenju na kontrolnom grupom. Yaman i Akdeniz [161] su takođe zabeležili smanjen sadržaj cinka u uzorcima tiroidnih adenoma. Smanjena koncentracija cinka vezuje se za inaktivaciju p53 tumor supresornih proteina, čija je smanjena ekspresija u korelaciji sa velikim brojem karcinoma, uključujući tiroidni [162]. U meta-analizi Gumelec-a i sar. [163] nije zabeležena značajna razlika u koncentraciji cinka u serumima pacijenata sa tiroidnim karcinomima, dok su njihovi rezultati za obuhvaćene tri studije na tkivnom nivou ukazali na značajno smanjenu koncentraciju cinka u malignim tiroidnim tkivima. Relativno ujednačena koncentracija velikog broja metala u tkivima sa BT u poređenju sa ZTT mogla bi da se objasni „neutralnom“ prirodom tiroidnog adenoma.

4.5. Maligni tumori

Ukupno je sakupljen 81 uzorak malignog tiroidnog tkiva i 81 uzorak zdravog tiroidnog tkiva od 81 pacijenta, od čega je 70 pacijenata imalo papilarni karcinom, 8 folikularni karcinom i troje medularni karcinom tiroidne žlezde. Kako je papilarni karcinom najčešći tiroidni malignitet i da je zato broj uzoraka sa papilarnim karcinomom bio veći u odnosu na ostale maligne forme, uni- i multivarijantna statistička obrada podataka za sadržaj metala i dva izabrana odnosa (Cu/Zn i Cd/Se) izvršena je samo za papilarni karcinom tiroidne žlezde, dok su rezultati za folikularni i medularni karcinom obrađeni na deskriptivan način.

U Tabeli 13a dati su osnovni podaci o ispitanicima, dok su u Tabeli 13b dati kliničko-patološki podaci o pacijentima sa papilarnim karcinomom.

Tabela 13a. Osnovni podaci o pacijentima sa papilarnim karcinomom.

	Pol		Uzrast (godine)		Pušački status		Veličina nodusa (cm)	
	Žene	Muškarci	< 50	> 50	Da	Ne	< 3	> 3
Papilarni karcinom	46	24	32	38	18	52	36	34

Tabela 13b. Kliničko-patološki parametri pacijenata sa papilarnim karcinomom.

	Naslednost		Invazija kapsule		Retrosternalnost		Diseminacija tumora	
	Da	Ne	Da	Ne	Da	Ne	Da	Ne
Papilarni karcinom	22	48	24	46	11	59	25	45

Najveći broj pacijenata sa papilarnim karcinomom nije imao genetičko opterećenje nekim od tiroidnih oboljenja, invaziju tiroidne kapsule, retrosternalni tiroidni rast, kao ni intratiroidnu diseminaciju tumora. Podaci za sadržaj metala i dva odnosa u papilarnom tiroidnom tkivu (PTT) grupisani su i statistički obrađeni sa *Mann-Whitney* U-testom, u cilju što jasnijeg sagledavanja uloge metala u patogenezi papilarnog karcinoma tiroidee. Sadržaj Cd i Cd/Se bio je značajan za razdvajanje pacijenata na osnovu pola i retrosternalnog tiroidnog rasta. Njihov sadržaj bio je veći u retrosternalnoj grupi pacijenata i takođe je bio veći u malignom tkivu muškaraca u odnosu na žene. Sadržaj Cd, U i Cd/Se bio je od značaja za razdvajanje dve starosne kategorije. Prisustvo tiroidne kapsule imalo je uticaj na sadržaj Mn i Zn. PTT sa prisutnom invazijom imala su manji sadržaj oba esencijalna metala. Značajne razlike u sadržaju metala nisu zabeležene u zavisnosti od unosa duvana i intratiroidne diseminacije ($p > 0.05$). Rezultati su prikazani u Tabeli 14a i 14b.

Table 14a. GM vrednosti sadržaja metala (u ng/g) i razlike između dva seta podataka potvrđene sa Mann-Whitney U testom.

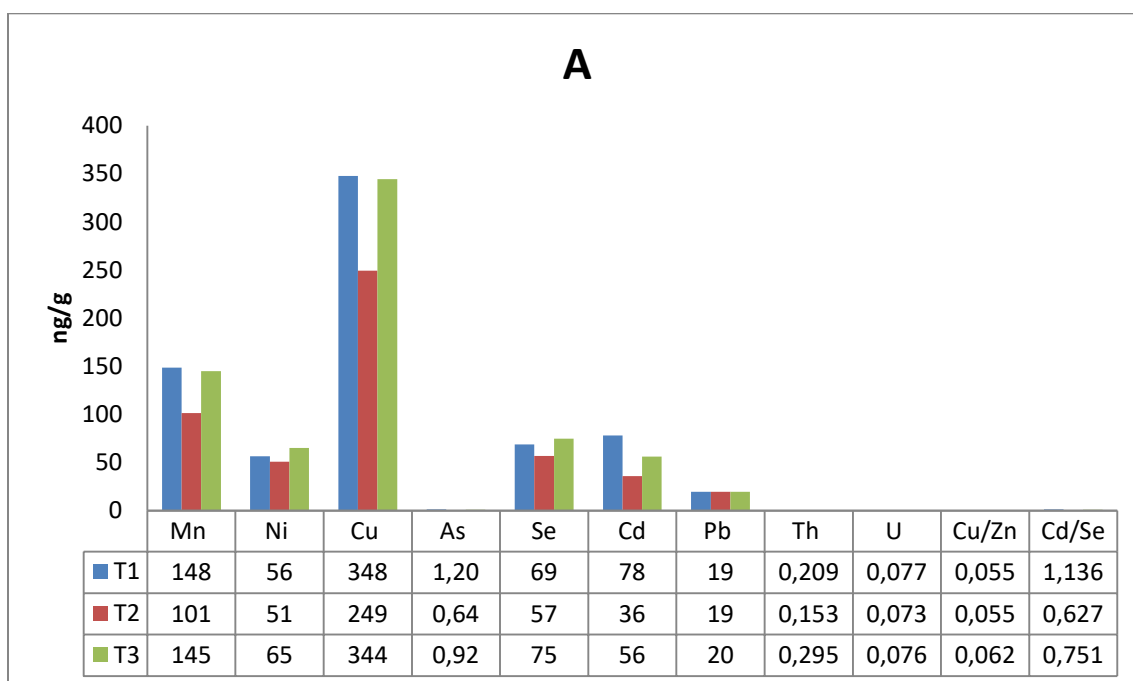
	Pol		Uzrast (godine)				Pušenje			Veličina nodusa (cm)		
	Žene	Muškarci	<i>p</i>	< 50	> 50	<i>p</i>	Da	Ne	<i>P</i>	< 3	> 3 cm	<i>p</i>
Mn	133	139	> 0,05	140	128	> 0,05	132	137	> 0,05	127	139	> 0,05
Ni	45	56	> 0,05	54	46	> 0,05	48	49	> 0,05	46	52	> 0,05
Cu	316	376	> 0,05	376	291	> 0,05	295	357	> 0,05	277	381	0,020
Zn	5612	6085	> 0,05	5581	5956	> 0,05	4454	5939	> 0,05	5106	6667	0,049
As	0,85	0,95	> 0,05	0,83	0,89	> 0,05	1,14	0,84	> 0,05	1,08	0,81	> 0,05
Se	66	68	> 0,05	63	64	> 0,05	65	65	> 0,05	63	67	> 0,05
Cd	47	94	0,036	43	97	0,008	80	57	> 0,05	62	57	> 0,05
Pb	18	16	> 0,05	18	17	> 0,05	22	18	> 0,05	18	18	> 0,05
Th	0,12	0,11	> 0,05	0,13	0,12	> 0,05	0,12	0,12	> 0,05	0,12	0,12	> 0,05
U	0,07	0,07	> 0,05	0,08	0,07	> 0,05	0,08	0,07	> 0,05	0,07	0,07	> 0,05
Cu/Zn	0,06	0,05	> 0,05	0,06	0,05	> 0,05	0,05	0,06	> 0,05	0,06	0,05	> 0,05
Cd/Se	0,84	1,60	0,022	0,69	1,31	0,04	1,24	0,88	> 0,05	0,90	1,03	> 0,05

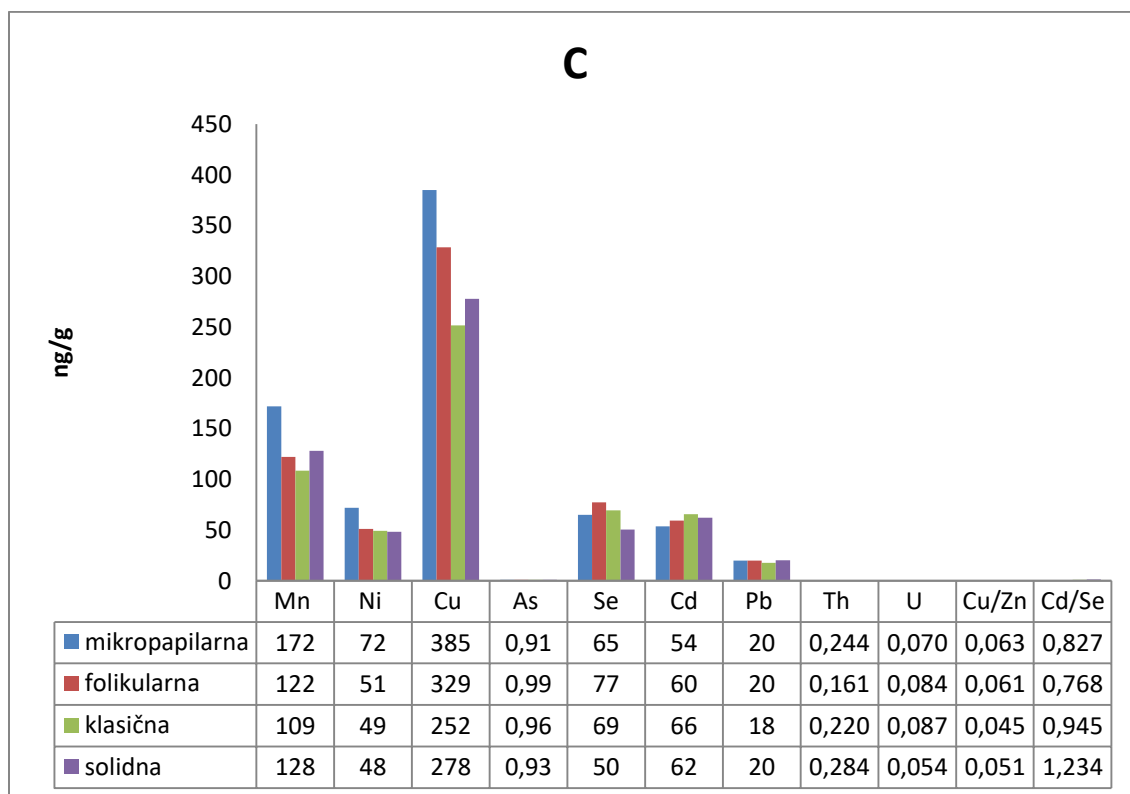
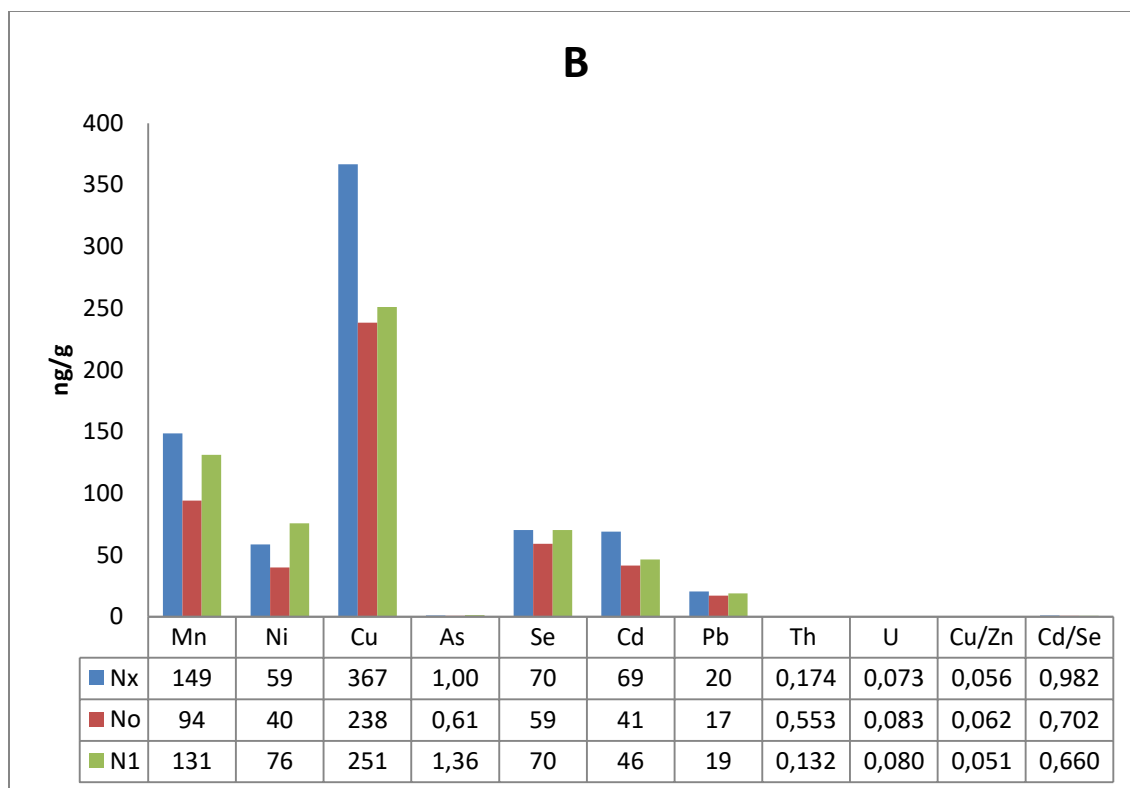
Table 14b. GM vrednosti sadržaja metala (u ng/g) i razlike između dva seta podataka potvrđene sa Mann-Whitney U testom.

	Naslednost			Invazija kapsule			Retrosternalnost			Diseminacija tumora		
	Da	Ne	<i>p</i>	Da	Ne	<i>p</i>	Da	Ne	<i>P</i>	Da	Ne	<i>p</i>
Mn	126	140	> 0,05	112	139	0,045	115	139	> 0,05	136	138	> 0,05
Ni	46	51	> 0,05	40	54	> 0,05	38	52	> 0,05	42	50	> 0,05
Cu	312	356	> 0,05	280	367	> 0,05	282	356	> 0,05	291	356	> 0,05
Zn	5939	5542	> 0,05	3913	6009	0,046	6667	5651	> 0,05	5922	5574	> 0,05
As	0,92	0,89	> 0,05	0,83	0,89	> 0,05	0,93	0,89	> 0,05	0,53	1,06	> 0,05
Se	67	64	> 0,05	63	67	> 0,05	77	64	> 0,05	68	61	> 0,05
Cd	69	58	> 0,05	45	63	> 0,05	119	51	0,030	59	57	> 0,05
Pb	19	18	> 0,05	19	18	> 0,05	18	18	> 0,05	15	18	> 0,05
Th	0,10	0,13	> 0,05	0,13	0,12	> 0,05	0,11	0,12	> 0,05	0,12	0,12	> 0,05
U	0,08	0,07	> 0,05	0,07	0,08	> 0,05	0,07	0,07	> 0,05	0,08	0,07	> 0,05
Cu/Zn	0,06	0,05	> 0,05	0,07	0,05	> 0,05	0,05	0,06	> 0,05	0,06	0,05	> 0,05
Cd/Se	0,76	1,06	> 0,05	1,00	0,99	> 0,05	1,53	0,90	0,022	0,86	1,05	> 0,05

Patohistološkom (PH) nalazom ustanovljenje su četiri varijante papilarnog karcinoma: folikularna (34,85%), mikropapilarna (31,82%), klasična (21,21%) i solidna varijanta (12,12%). Druge PH varijante nisu pronađene. Prema TNM klasifikaciji, 30 pacijenata bilo je u početnom (T1) stadijumu bolesti, dok je samo jedan pacijent bio u uznapredovalom (T4) stadijumu bolesti. Broj pacijenata sa T2 i T3 stadijumom bolesti bio je isti ($n = 17$). Kod najvećeg broja pacijenata ($n = 44$) metastaze u regionalnim limfnim čvorovima nisu bile procenjene (Nx), jer nije bilo preoperativnih nalaza koji bi mogli da ukazu na postajanje sekundarnih depozita u limfnim čvorovima, a koji bi bili otklonjeni cervikalnom limfadenektomijom. Kod pacijenata kod kojih je učinjena limfadenektomija pokazano je da je broj pacijenata sa prisutnom metastazom (N1) i bez nje (No) u regionalnim limfnim čvorovima bio 9 i 13, respektivno. Udaljene metastaze (Mx) nisu dijagnostikovane ni kod jednog pacijenta sa papilarnim karcinomom.

Kruskal–Wallis-ov test je primenjen da se uporede sadržaji metala za četiri PH varijante, tri T i tri N stadijuma bolesti. Ukoliko bi Kruskal–Wallis-ov test ukazao na statistički značajnu razliku između GM vrednosti ($p < 0.05$), višestruko poređenje je dodatno učinjeno (Z-vrednost) da bi se što jasnije videlo gde se razlike javljaju (Tabela 15). Rezultati ukazuju da je sadržaj Se i U značajan za razdvajanje folikularne varijante od solidne. Prema progresiji bolesti, sadržaj Mn i Cd imao je uticaj na razdvajanje T1 od T2, dok je Mn takođe bio značajan za razdvajanje T2 grupe od T3. Glavni metali za razdvajanje No od Nx bili su Mn, Pb i Th (Slika 33 i Tabela 15).





Slika 33. Distribucija sadržaja metala u zavisnosti od
A) T stadijuma, B) N stadijuma i C) PH varijante papilarnog karcinoma.

Tabela 15. Kruskal–Wallis-ov test za razdvajanje četiri PH tipa, tri T i tri N stadijuma bolesti.

	PH tip		T stadijum		N stadijum	
	<i>p</i>	Fisher (LSD)	<i>p</i>	Fisher (LSD)	<i>p</i>	Fisher (LSD)
Mn	0.1370	/	0.0468	T1(T2) T2(T3)	0.0226	N0(Nx)
Ni	0.6079	/	0.7534	/	0.3556	/
Cu	0.2923	/	0.2556	/	0.0940	/
Zn	0.9557	/	0.4340	/	0.1432	/
As	0.7043	/	0.0121	/	0.3308	/
Se	0.0481	Folikularna (solidna)	0.0409	T1(T2)	0.6942	/
Cd	0.8145	/	0.6058	/	0.2894	/
Pb	0.6441	/	0.9889	/	0.0226	N0(Nx)
Th	0.7884	/	0.1965	/	0.0089	N0(Nx)
U	0.0434	Folikularna (solidna)	0.8067	/	0.3556	/
Cu/Zn	0.2157	/	0.7396	/	0.0940	/
Cd/Se	0.5404	/	0.1843	/	0.1432	/

Parametri deskriptivne statistike za sadržaj 10 metala i dva odnosa u PTT i kontroli dati su u Tabeli 16. Kontrolna grupa obrazovana je od ZTT sakupljenih od istih ispitanika sa najveće moguće udaljenosti od primarnog tumora, koji je bio jasno demarkiran (tzv. *self-control* grupa, $n = 70$). Značajna razlika u sadržaju metala i izabranim odnosima metala između grupa potvrđena je sa *Mann-Whitney U* testom. Pronađen je veći sadržaj Cd, U i Cd/Se u PTT, kao i veći sadržaj Ni i Se u kontroli ($p < 0,05$). Poređenje sadržaja metala između dve grupe prikazano je na Slici 34.

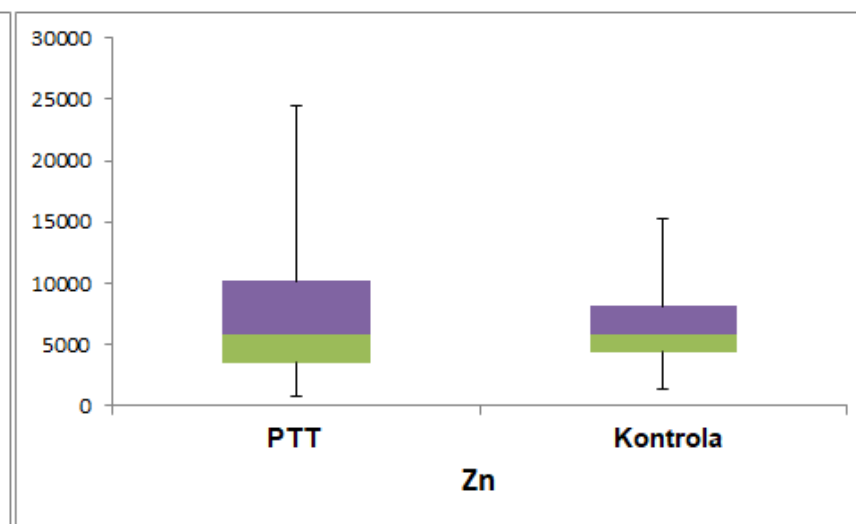
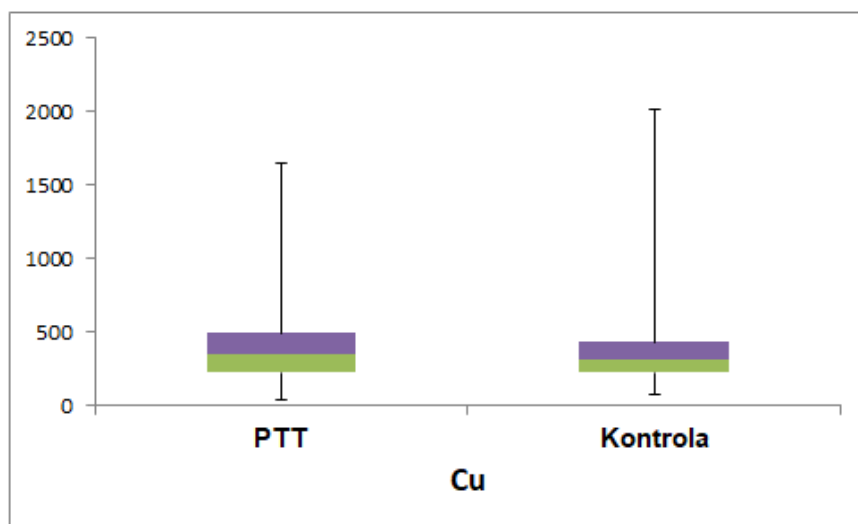
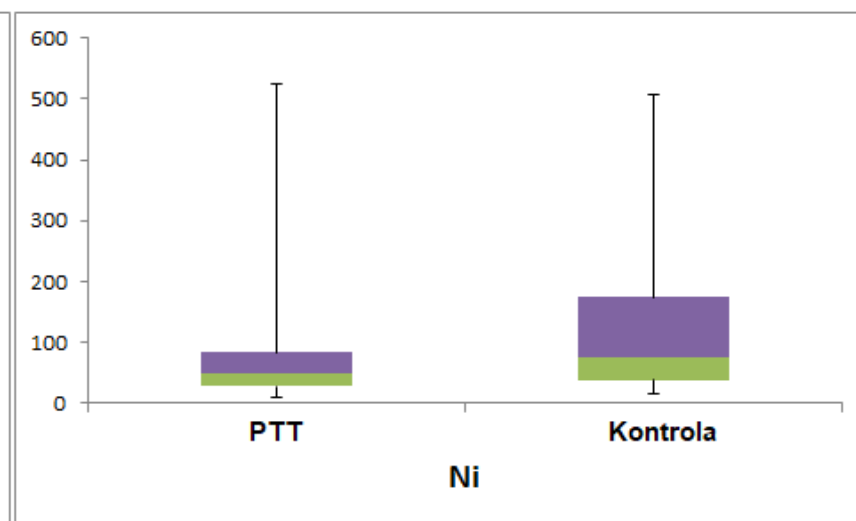
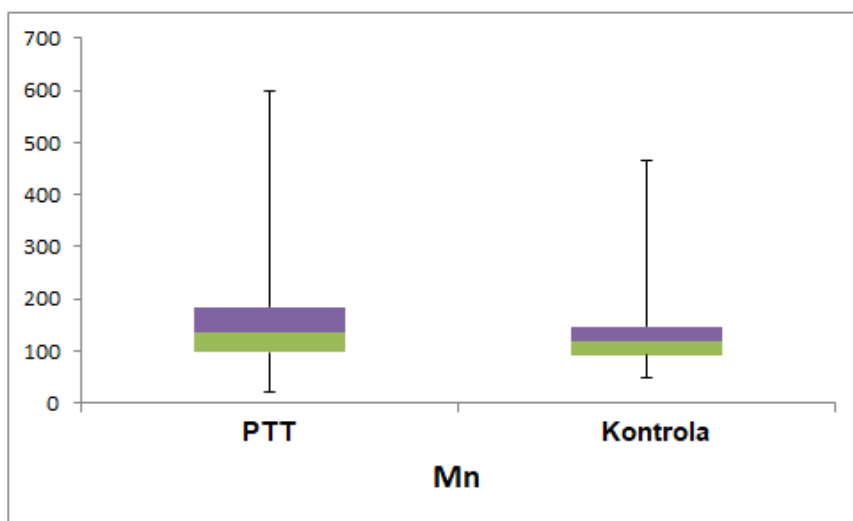
Tabela 16. Parametri deskriptivne statistike za sadržaj metala u PTT i kontrolnim tkivima (ng/g).

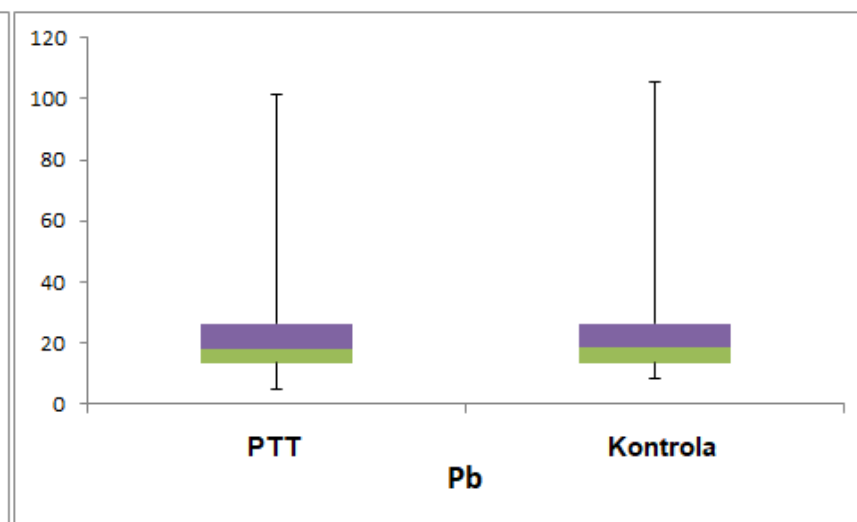
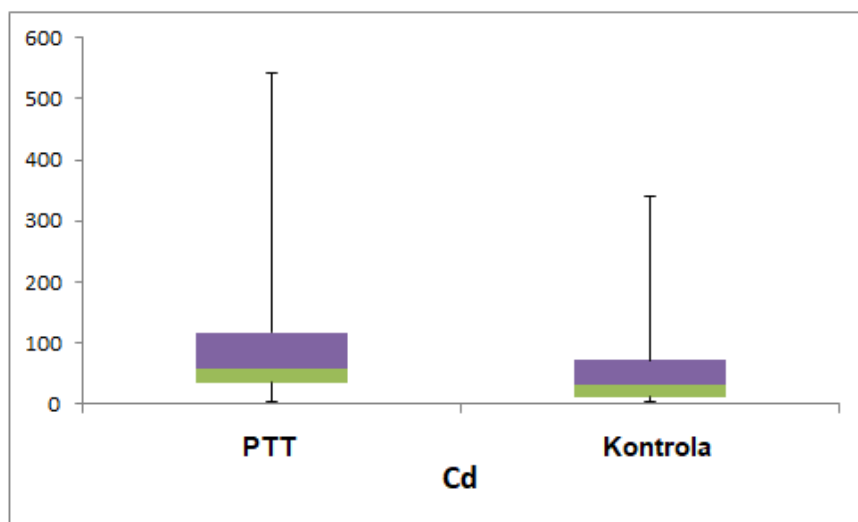
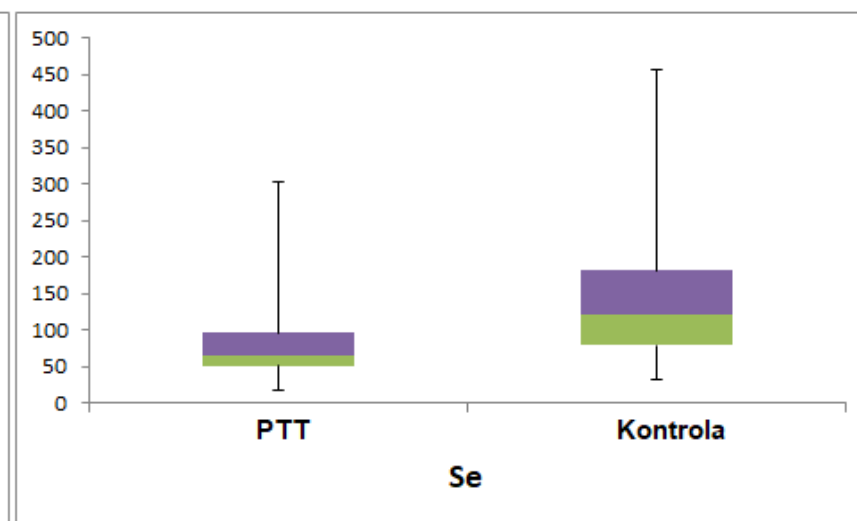
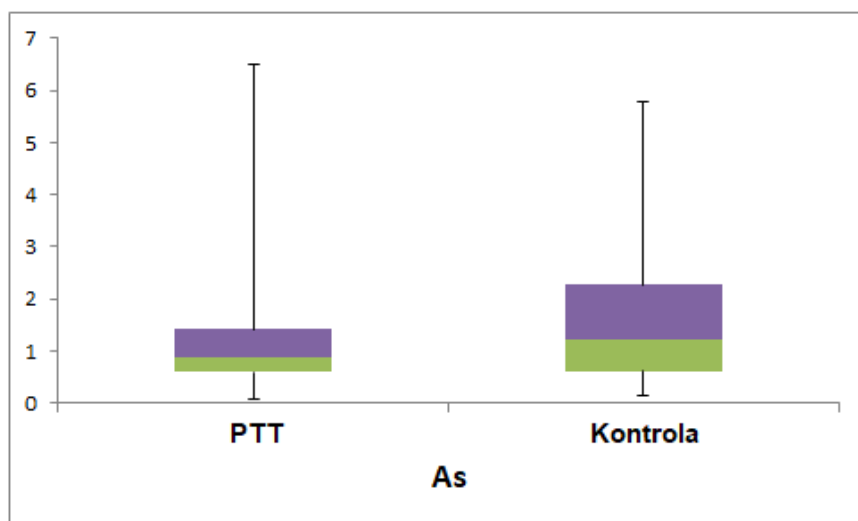
		Mn	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Cu/Zn	Cd/Se
PTT	medijana	137	48	355	5760	0,89	66	58	18	0,12	0,07	0,06	0,99
	min	23	11	35	830	0,07	18	3	5	0,02	0,01	0,02	0,06
	max	598	525	1656	24510	6,49	302	543	102	11,2	0,40	0,21	7,34
	IQR	86	55	271	6664	0,81	46	82	13	0,14	0,04	0,04	1,32
Kontrola	medijana	120	75	319	5896	1,23	122	33	19	0,12	0,04	0,05	0,31
	min	49	15	77	1319	0,15	32	2	8	0,01	0,00	0,02	0,02
	max	466	508	2018	15233	5,78	458	340	106	8,70	0,17	0,29	2,64
	IQR	55	136	207	3708	1,65	103	59	13	0,12	0,04	0,04	0,38
U-test	p-vred.	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05

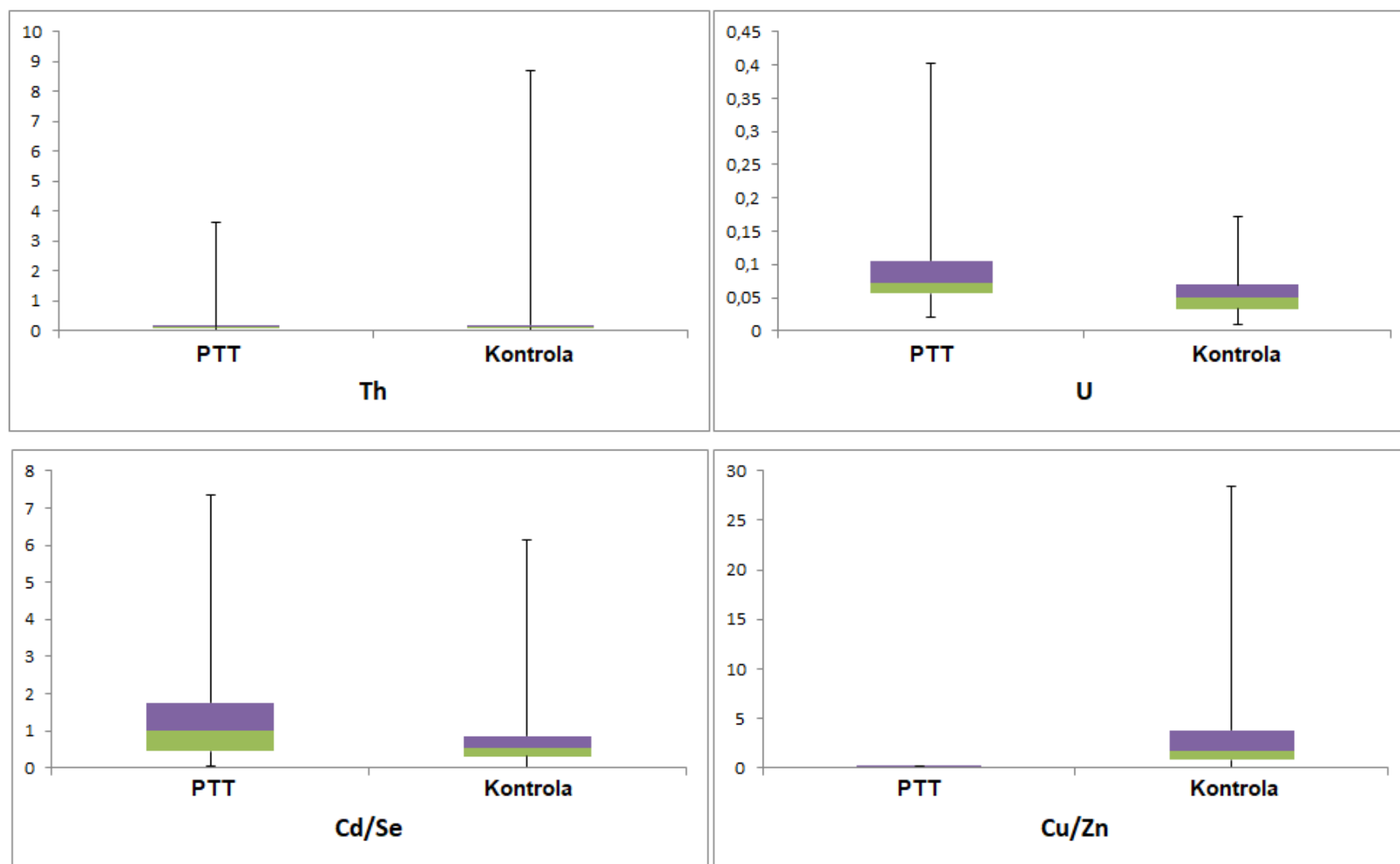
Pored univarijantne analize, PCA i LDA su primenjene za razdvajanje PTT od kontrole. Prvi PCA model, koji je obuhvatao sve podatke za ispitivane metale, nije pokazao visok stepen varijabiliteta (dve glavne komponente činile su svega 37,03% ukupnog varijabiliteta podataka) (Slika 35). Drugi, optimizovani PCA model je primenjen za onaj set podataka koji se pokazao značajnim u razdvajanju dve grupe na osnovu *Mann-Whitney U* testa. Dobijen je trokomponentni

model, koji je obuhvatio 75,91% ukupnog varijabiliteta podataka. Prva komponenta, PC1, je obuhvatila 32,89%, druga, PC2, 26,14% i treća komponenta, PC3, 16,88% ukupnog varijabiliteta podataka. Projekcije faktora skorova i uzajamne projekcije koeficijenata latentnih varijabli vektora za prvu i treću komponentu prikazane su na Slici 36a. Model plota skorova ukazuje na prisustvo dve delimično preklapljene grupe duž PC1 smeru. Najuticajniji parametri koji su razdvojili kontrolnu grupu bili su Ni i Se. Najveći pozitivan uticaj duž PC1 smeru imali su Cd i Cd/Se i oni su ujedno bili glavni parametri za razdvajanje PTT od kontrole (Slika 36b).

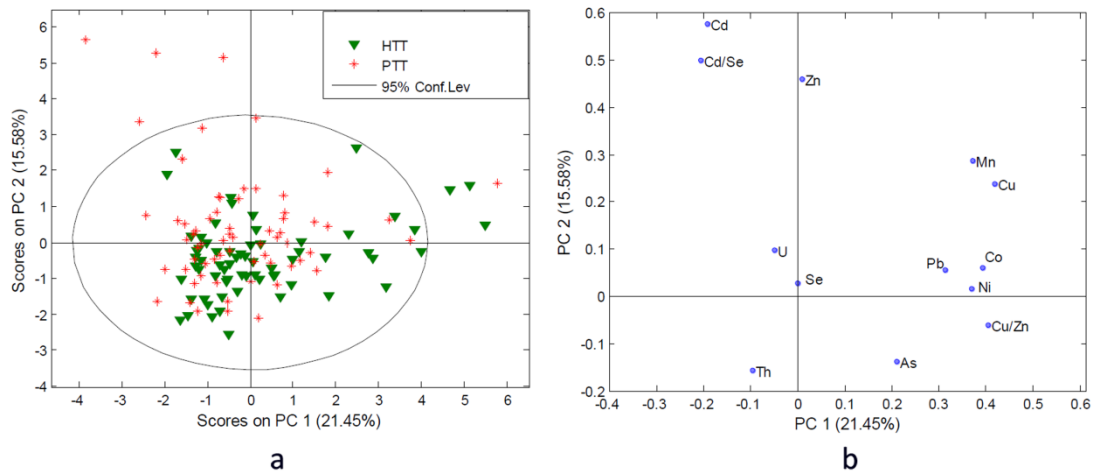
LDA je primenjena u cilju utvrđivanja pouzdanijeg kriterijuma za razdvajanje dve grupe. LD analizom je dobijena jedna kanonska funkcija, koja objašnjava 100% ukupnog varijabiliteta, sa sopstvenom vrednošću od 0,51 koja pokazuje značajnost ($F = 10,50$ i vrednošću Wilks-ovog parametra od 0,664). Za identifikaciju glavnih parametara korišćeni su standardizovani kanonski koeficijenti, a najveća apsolutna vrednost dobijena je za Cd/Se ($F_1 = -0.67$), U ($F_1 = -0.54$) i Se ($F_1 = +0.50$). Od ukupno 70 kontrolnih uzoraka, 54 uzorka je bilo normalno klasifikovano, dok je od 70 uzoraka PTT, 54 uzorka bilo normalno klasifikovano. Preostali broj uzoraka iz obe grupe pokazao je preklapanja u sadržaju metala. Dobijeni model pokazao je dobru snagu u razdvajanju PTT od kontrole (Slika 36c).



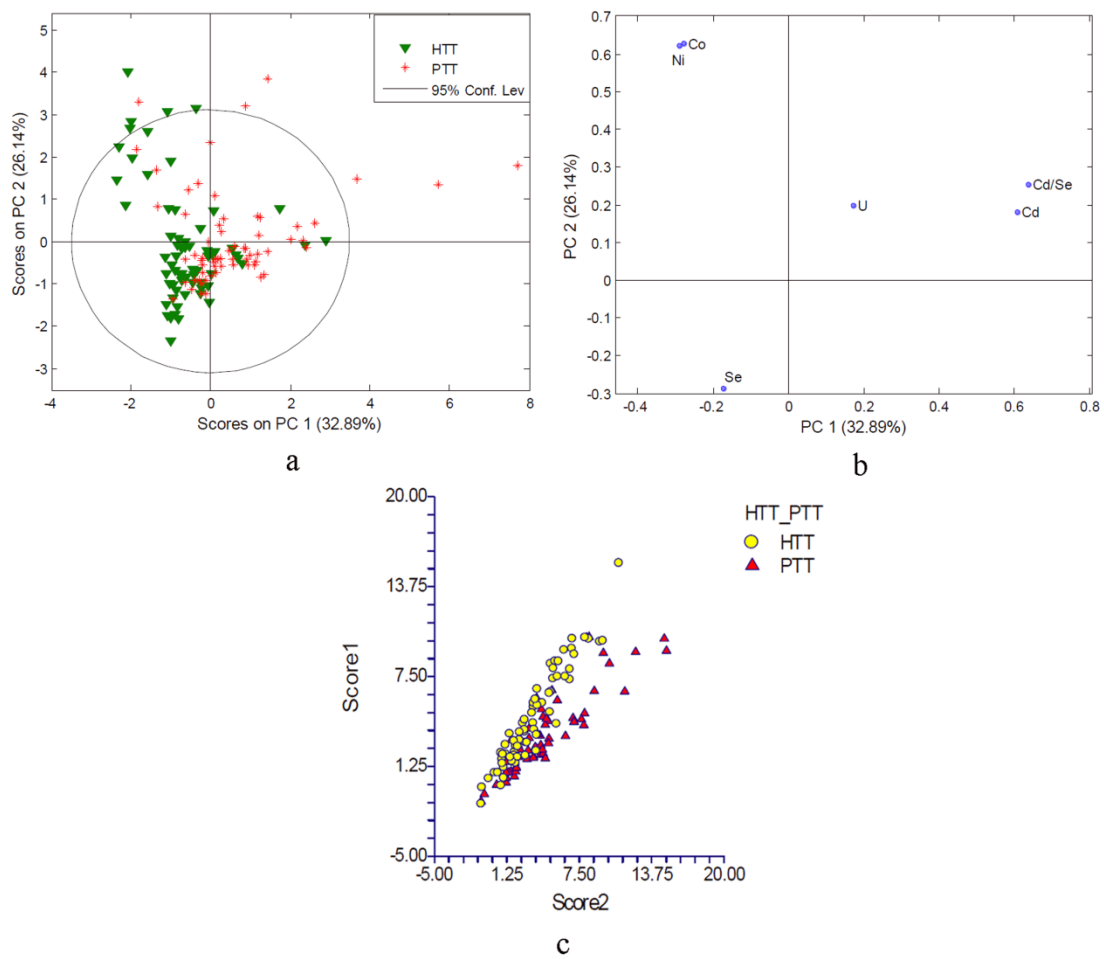




Slika 34. Box-plotovi za sadržaj metala i dva odnosa u PTT i kontroli (ng/g).



Slika 35. PCA model za kompletan set podataka.



Slika 36. PCA i LDA model za optimizovani set podataka.

Najznačajniji metal koji je razdvojio PTT od kontrole bio je kadmijum. Kadmijum je dobro poznati humani karcinogen. Međunarodna agencija za istraživanje kancera uvrstila je Cd u grupu I humanih kancerogena, zbog negativnih efekata na renalni, skeletni i respiratorni trakt [164]. Kadmijum se u organizam unosi inhalatorno (preko zagađenog vazduha i/ili duvana) i ingestijom (preko kontaminirane pijaće vode i hrane) [165-168]. Utvrđeno je da jedna cigareta sadrži 1-2 µg kadmijuma [143] i povećane koncentracije kadmijuma zabeležene su u krvi pušača u odnosu na nepušače [169-174]. Polужivot kadmijuma u određenim organima može da dostigne period do 30 godina, zbog nedostatka aktivnog biohemijskog mehanizma za uklanjanje metala iz organizma [175]. Kancerogeni efekti kadmijuma na pluća, prostatu i testise su dobro prepoznati [176], dok su nedavno zabeleženi njegovi negativni efekti u etiologiji kancera dojke, pankreasa i bubrega [166]. Uloga kadmijuma u kanceru tiroidne žlezde nije dovoljno ispitana. Autopsijske studije su utvrdile da je kadmijum prisutan u tiroidnom tkivu nakon svega dvadeset godina života kao i da je njegova koncentracija u tiroidnoj žlezdi najveća između četvrte i šeste decenije života. Studije su takođe ukazale da je sadržaj Cd u štitastoj žlezdi tri puta veći kod ljudi koji žive u područjima koja su zagađena ovim metalom u odnosu na neindustrijska područja [176]. Nedavno je zabeležena povećana koncentracija kadmijuma u punoj krvi pacijenata sa tiroidnim kancerom [177].

Smanjena koncentracija selen u serumu pacijenata sa tiroidnim kancerom zabeležena je u meta-analizi Shen-a [178] i pilot studiji Jonklaas-a i sar. [179]. Hemoprotektivni uticaj selen na kancer vezuje se za njegovu sposobnost da indukuje apoptozu, inhibira rast tumora i dalje širenje tumora [180,181]. Utvrđeno je da selen štiti folikularne ćelije od oštećenja uzrokovanim teškim metalima, kao i da smanjuje oksidativni stres [182,183]. Akcija selen nije samostalna i odvija se preko selenoproteina. Smanjena koncentracija dovodi do pada aktivnosti selenoproteina i povećanog rizika za razvoj tiroidnog kancera [117]. Santos i sar. [108] istakli su da smanjeni nivoi selen u kancerogenom tkivu dovode do promene u ekspresiji i aktivnosti GP_x i jodotironin dejodinaze (DIO1 i DIO2). Schmutzler i sar. [184] su pronašli da je *selenium binding protein 1* značajno eksprimiran u ZTT, ali ne i u PTT. Metere i sar. [183] pronašli da je kod pacijenata sa papilarnim tiroidnim karcinomom smanjena ekspresija GP_x1 i tioredoksin reduktaze u poređenju sa kontrolom.

Rezultati našeg istraživanja jasno ukazuju da je sadržaj kadmijuma značajno povećan u PTT (58 ng/g) u odnosu na kontrolu (33 ng/g), kao i da je sadržaj selen značajno smanjen u

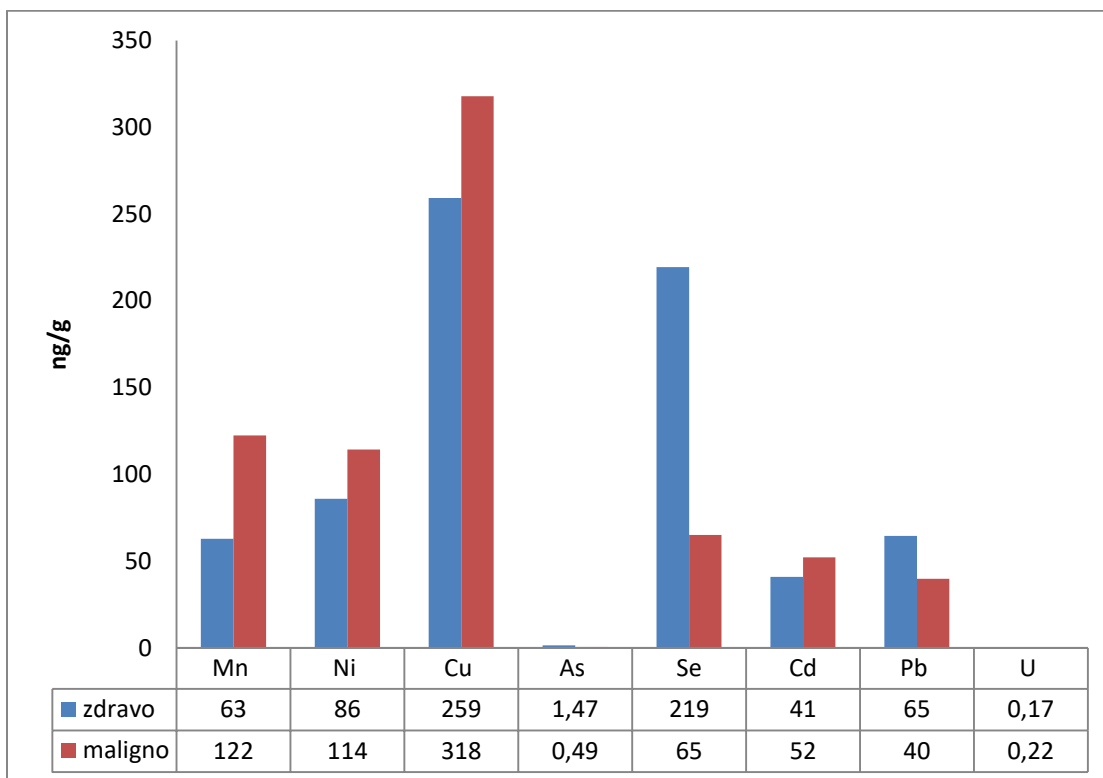
PTT (66 ng/g) u odnosu na kontrolu (122 ng/g). Kobayashi i sar. [185] ispitali su uticaj 12 teških metala na humanu liniju tiroidnih ćelija *in vitro* i pronašli da je najveći uticaj na ćelijsku smrt imao kadmijum. Oni su takođe pronašli da se toksičnost kadmijuma smanjuje dodavanjem velike koncentracije natrijum-selenita. Ovi rezultati mogli bi da podrže negativnu korelaciju dobijenu za kadmijum i selen u PTT ($r_s = -0,69$). Kako ovaj tip korelacije nije utvrđen u kontrolnoj grupi ($r_s = 0,19$), naši rezultati bi mogli da objasne antagonistički efekat istiskivanja selena iz PTT-a pod uticajem povećane koncentracije kadmijuma. Chung i sar. [186] utvrdili su da je hronično nakupljanje kadmijuma u tiroidnom tkivu jedan od ključnih faktora za progresiju tiroidnog kancera. Naši rezultati ukazuju da kadmijum nema ulogu u progresiji bolesti, ali ukazuju da bi Cd mogao da igra ključnu ulogu u iniciranju kancerogeneze, jer je najveći sadržaj Cd pronađen u T1 stadijumu bolesti (Slika 32). Rezultati Chung-a i sar. [186] takođe ukazuju da je koncentracija selena najveća kod pacijenata u TNM stadijumu 3 u poređenju sa pacijentima u TNM stadijumu 1. Ovi rezultati su u saglasnosti sa našim, ali bez statistički značajne razlike za sadržaj selena u T3 stadijumu bolesti (75 ng/g) i T1 stadijumu bolesti (69 ng/g). Međutim, naši rezultati ukazuju da je sadržaj mangana imao značajnu ulogu u razdvajanju T1 grupe od T2 (148 naspram 101 ng/g) i T2 grupe od T3 (101 naspram 145 ng/g). Takođe, sadržaj mangana i cinka bio je značajno smanjen u tiroidnim tkivima sa prisutnom invazijom kapsule (Tabela 14b).

Cu/Zn odnos je duži niz godina predlagan za dijagnostički ili prognostički marker velikog broja patoloških stanja, uključujući karcinome [187-190]. Naši rezultati jasno ukazuju da odnos Cu/Zn nema značaj u razdvajanju papilarnog karcinoma od kontrole. Suprotno, Cd/Se pokazao se pogodnim kandidatom za papilarni karcinom tiroidne žlezde, kao i za razdvajanje pacijenata sa retrosternalnom tiroidnom žlezdom (Tabela 14b).

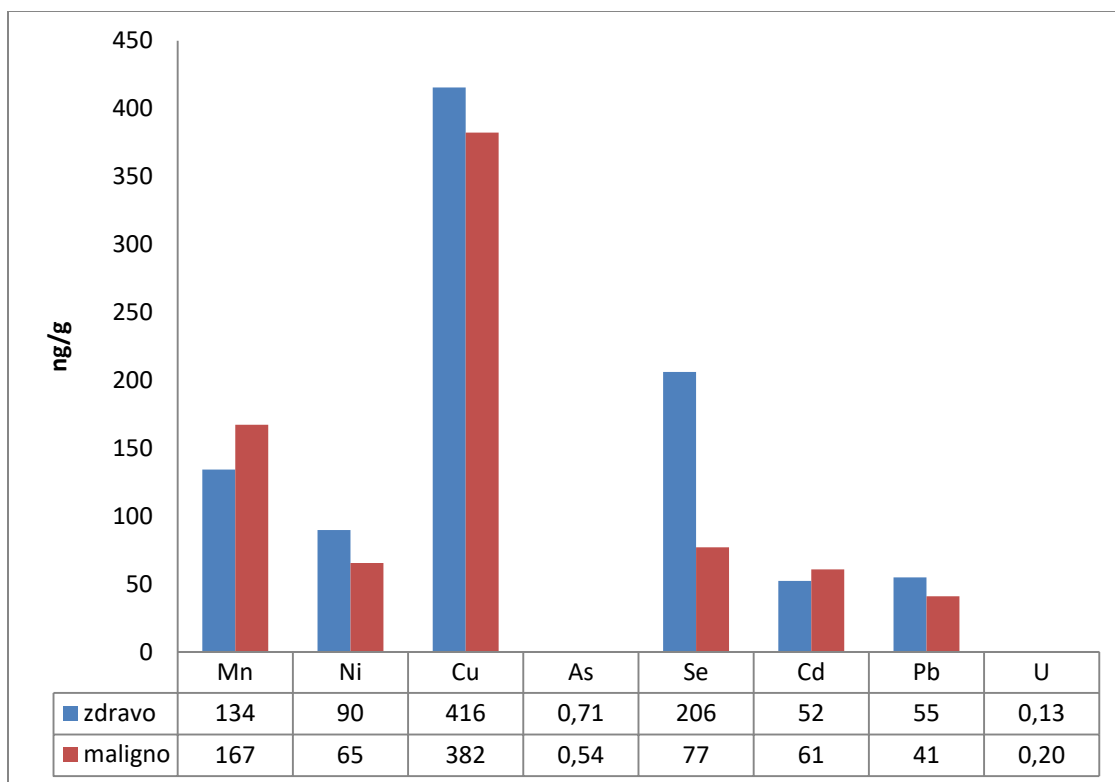
Sadržaj radioaktivnih metala u tiroidnom tkivu nije poznat. Naši rezultati ukazuju da je sadržaj U i Th značajno povećan u PTT. Detektabilni tragovi oba metala pronađena su u ZTT. Interesantan podatak je da je uranijum razdvojio folikularnu varijantu papilarnog karcinoma od solidne (Slika 33). Stojšavljević i sar. [145] odredili su koncentraciju U i Th u punoj krvi odrasle srpske populacije ($n = 305$) i utvrdili značajno povećane koncentracije oba radioaktivna i teška metala (i do 100 puta veće) u poređenju sa drugim populacionim grupama širom sveta. Povećan sadržaj U i Th u ispitivanim uzorcima tiroidnog tkiva mogao bi da se poveže sa činjenicom da je naša zemlja pretrpela vazdušne napade za vreme bombardovanja. Hon i sar. [191] istakli su da je na Saveznu Republiku Jugoslaviju u periodu od 24. marta do 10. juna 1999. godine bačeno oko

8,5 tona depletiranog (osiromašenog) uranijuma. Autori su takođe istakli da je kod osoba koje su učestvovalе u vojnim operacijama i kod civilnog društva zabeležana povećana učestalost velikog broja malignih bolesti. Prema procenama Vojske Jugoslavije ispaljeno je oko 50 000 metaka sa oko 15-20 tona osiromašenog uranijuma [192]. Razjašnjenje o tome da li se radi o prirodnom ili osiromašenom uranijumu u ispitivanim uzorcima tiroidnog tkiva korišćeni ICP-MS instrument ne može da pruži zbog nemogućnosti tačnog i preciznog određivanja odnosa $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$.

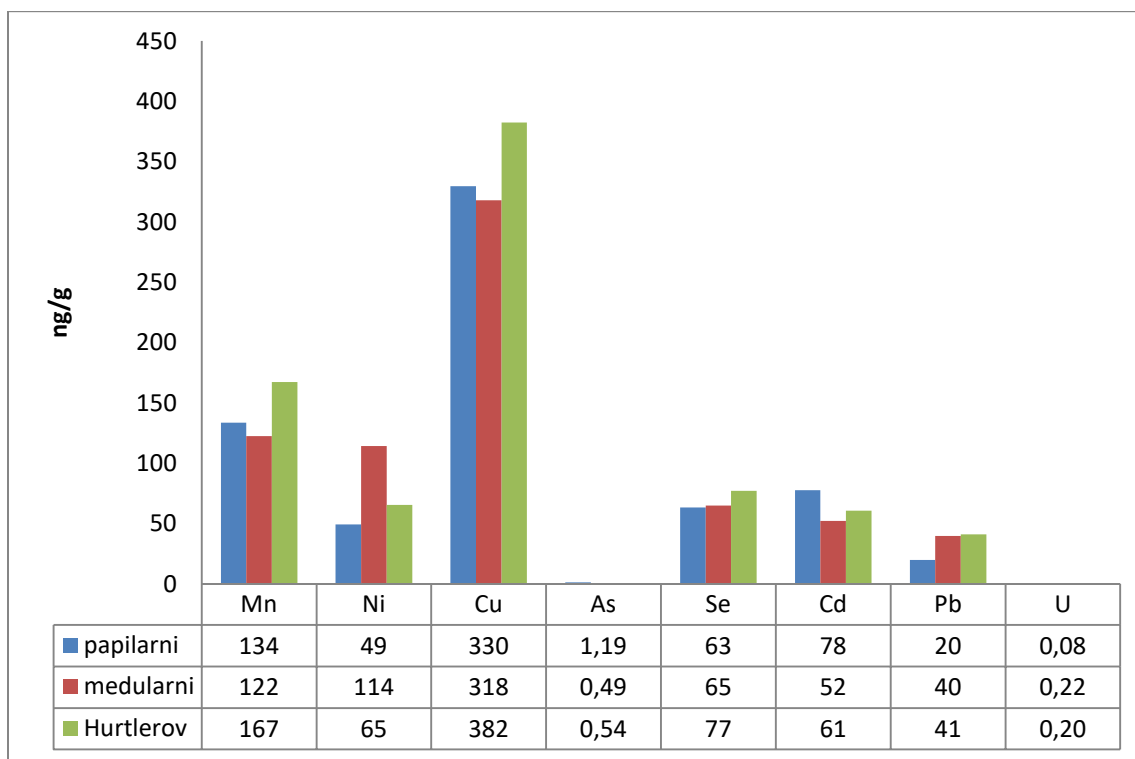
Poređenje GM vrednosti za sadržaj metala u malignom i zdravom tkivu sakupljenom od istog pacijenta sa medularnim tiroidnim karcinomom prikazano je na Slici 37, dok je poređenje GM vrednosti za sadržaj metala u malignom i zdravom tkivu sakupljenom od istog pacijenta sa Hirtlovim tiroidnim karcinomom prikazano na Slici 38. Od esencijalnih elemenata zabeležena je smanjena koncentracija Se i Mn, posebno u medularnom karcinomu. U odnosu na PTT, koja su imala najveći sadržaj Cd, tkiva pacijenata sa ovim retkim tipovima tiroidnih karcinoma imala su povećani sadržaj U (Slika 39).



Slika 37. Poređenje sadržaja metala u tkivu pacijenata sa medularnim karcinomom.



Slika 38. Poređenje sadržaja metala u tkivu pacijenata sa Hirtlovim karcinomom.



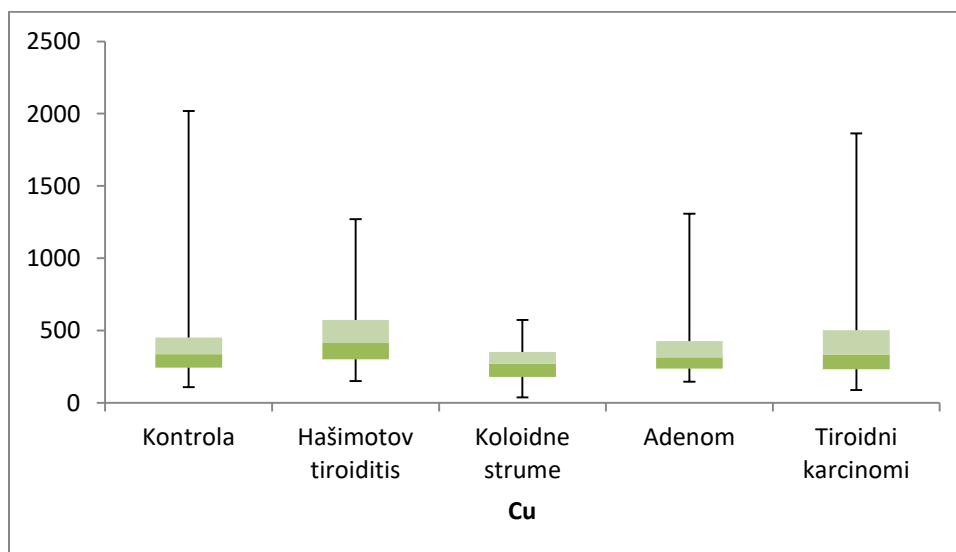
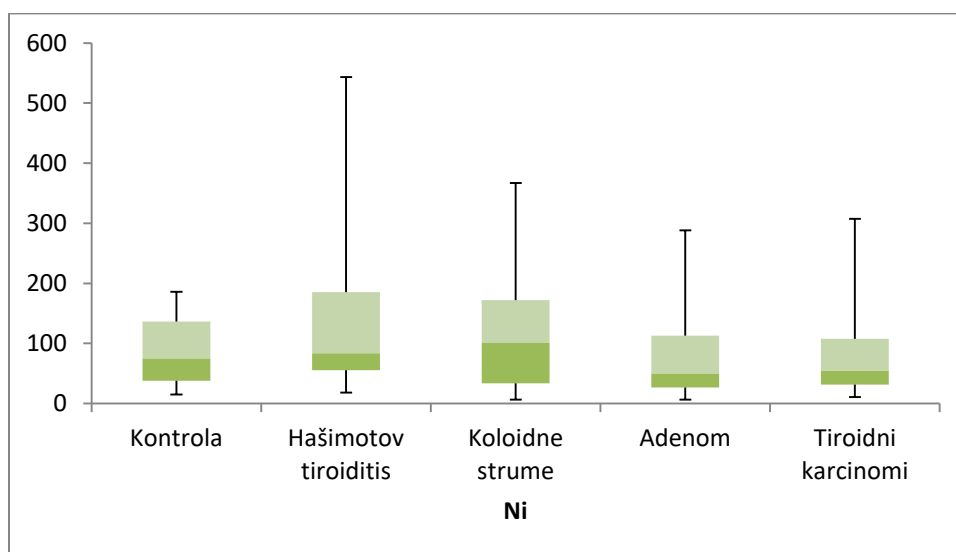
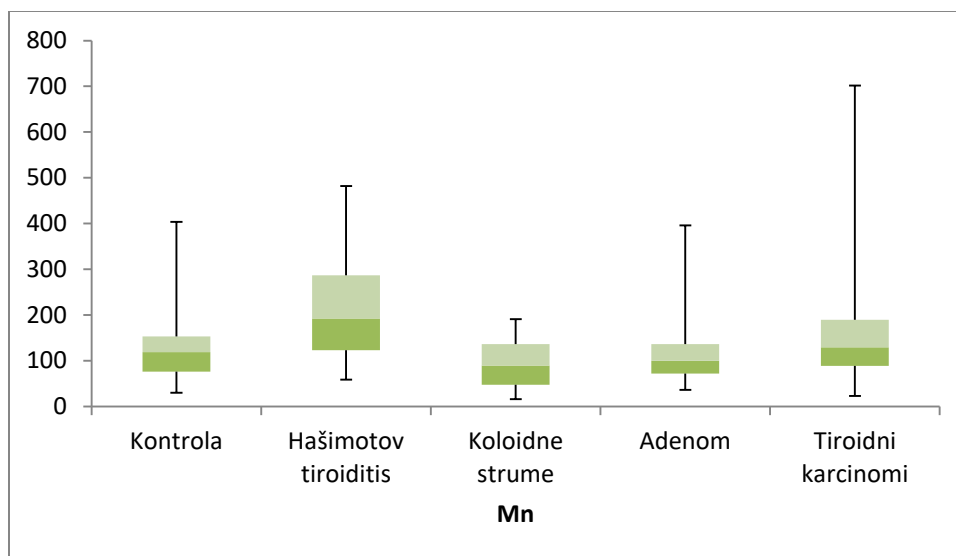
Slika 39. Poređenje sadržaja metala u tkivima malignih tumora.

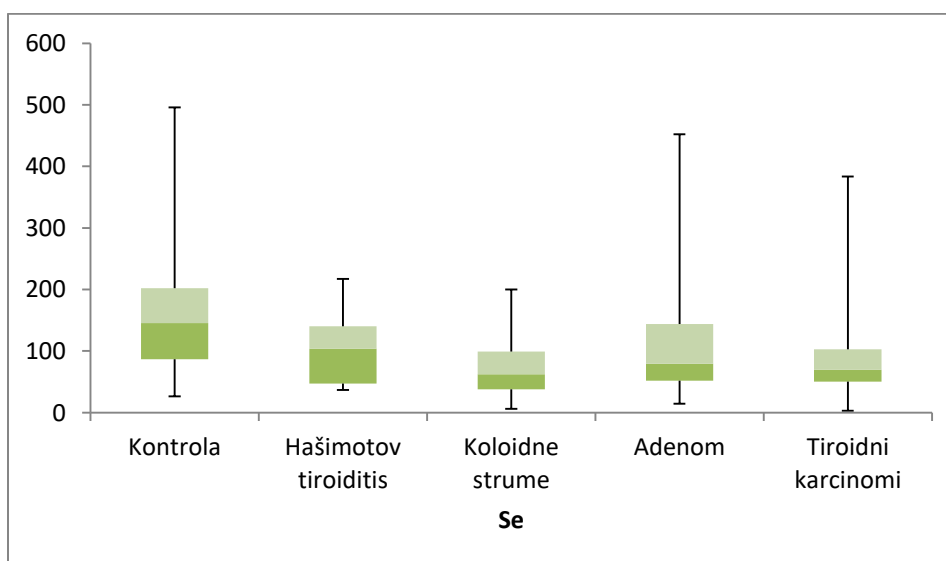
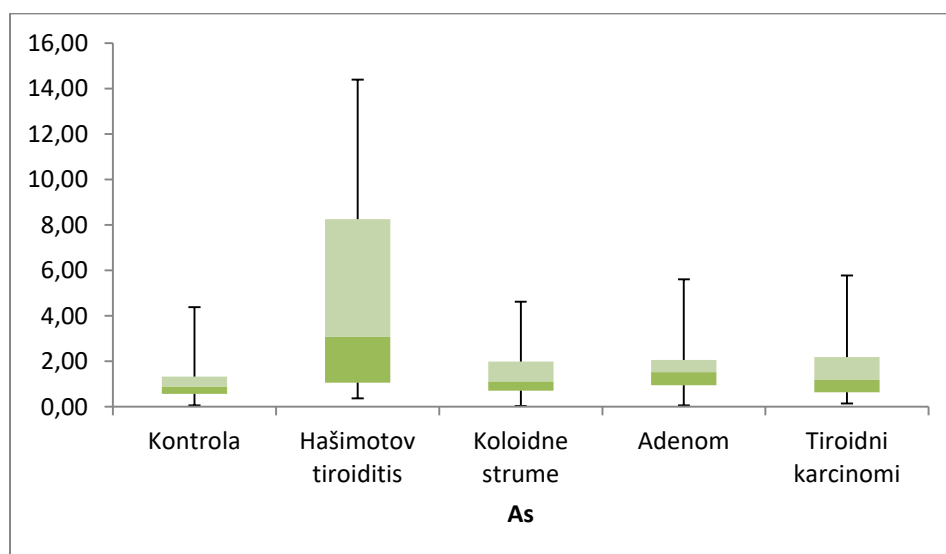
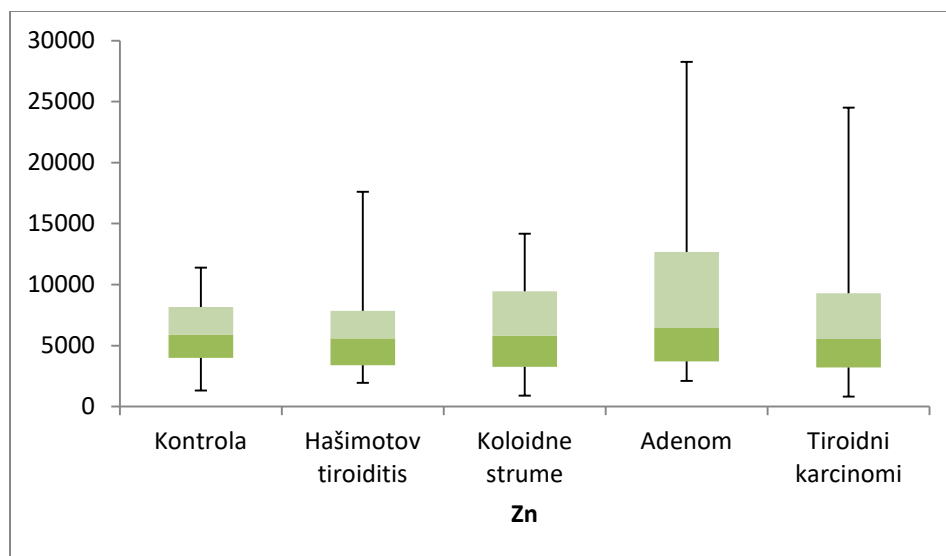
4.6. Komparivna analiza svih patoloških stanja (entiteta)

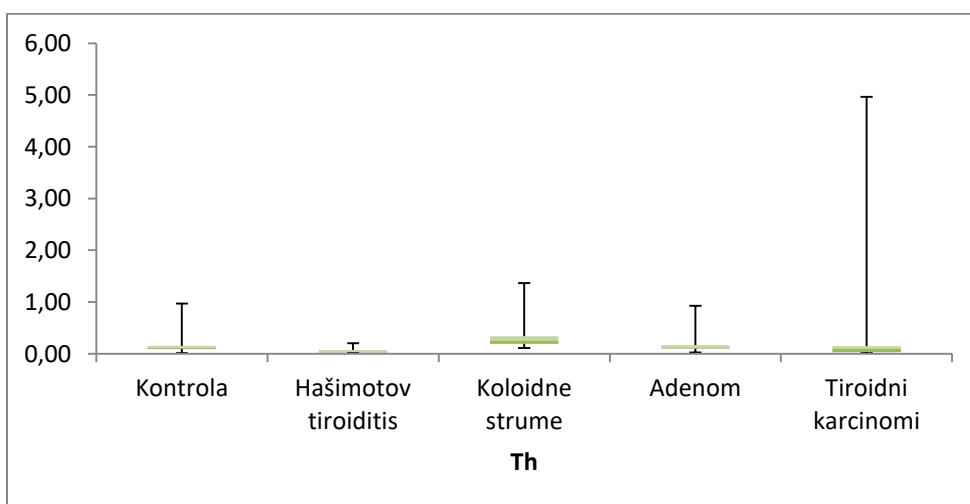
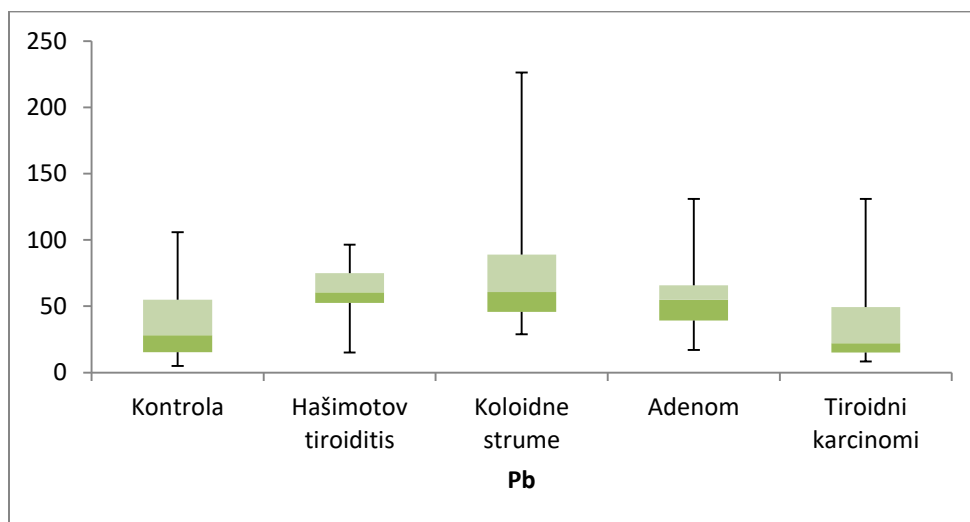
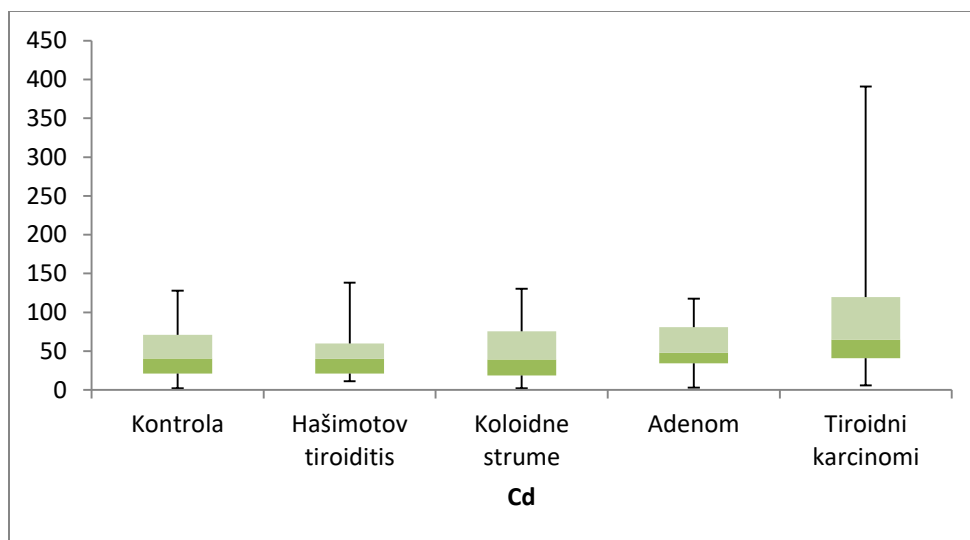
Sumirani rezultati za sva ispitivana patološka tkiva i komparativna analiza sa ZTT data je u Tabeli 17. Statistički značajna razlika između grupa na nivou pouzdanosti 0,05 potvrđena je sa Kruskal-Wallis-ovim testom. Razdvajanje između grupa postignuto je pomoću Fisher-ovog LSD faktora. Grafički prikaz sadržaja metala u kontroli i po patološkim stanjima prikazan je na Slici 40.

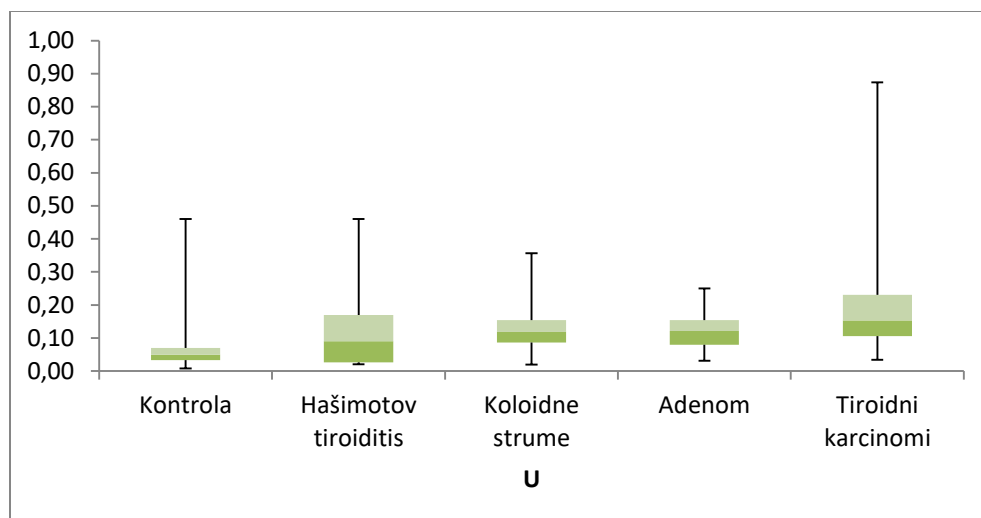
Tabela 17. Komparativna analiza sadržaja metala između kontrolne grupe i patoloških stanja.

		ZTT (1)	BT (2)	HT (3)	KS (4)	Maligni tumori (5)	<i>p-vrednost</i>	LSD (Fisher)	
Mn	GM	113	102	185	88	132	<0.0001	1(3,4)	3(4,5) 2(3,5)
	P5	48	40	78	27	46			4(5)
	P95	230	247	471	262	317			
Ni	GM	69	51	96	77	59	>0,05	-	
	P5	21	15	25	9	21			
	P95	166	182	294	350	263			
Cu	GM	333	328	410	278	333	0.0003	1(3,4)	3(4) 2(3) 4(5)
	P5	153	177	187	128	131			
	P95	715	732	684	696	704			
Zn	GM	5576	6684	5293	5290	5577	>0,05	-	
	P5	2616	2183	2065	1632	1959			
	P95	10050	23368	11842	14656	13855			
As	GM	0.90	1.28	3.13	1.20	1.09	<0.0001	1(2,3,4)	2(3)
	P5	0.19	0.19	0.48	0.42	0.34			
	P95	3.95	3.06	14.18	3.78	4.04			
Se	GM	133	85	91	85	65	<0.0001	1(2,3,4,5)	4(5)
	P5	40	28	40	32	19			
	P95	350	307	172	303	146			
Cd	GM	34.8	44.4	38.1	53.3	72.9	<0.0001	1(5)	2(5)
	P5	6.4	12.8	11.9	13	32.9			
	P95	107	112	125	206	245			
Pb	GM	28.9	49.4	69.9	75.2	22.2	<0.0001	1(2,3,4,5)	2(4,5)4(5)
	P5	10.5	21.5	16.6	30.1	9.8			
	P95	81.4	86.5	168.6	191.2	75.5			
Th	GM	0,13	0,14	0,03	0,27	0,10	>0,05	-	
	P5	0,04	0,07	0,01	0,13	0,01			
	P95	0,67	0,70	0,15	1,15	3,19			
U	GM	0.09	0.13	0.09	0.15	0.18	<0.0001	1(2,3,4)	2(3,5)
	P5	0.02	0.06	0.04	0.09	0.08			
	P95	0.34	0.32	0.23	0.39	0.41			









Slika 40. Komparativna analiza sadržaja metala između kontrole i pojedinačne tiroidne patologije.

6. ZAKLJUČAK

ICP metode su uspešno primenjene za tačno i precizno određivanje koncentracija deset metala (Mn, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Pb, Th i U) u uzorcima tkiva tiroidne žlezde. Metalomika esencijalnih i toksičnih metala u benignim i malignim oboljenjima tiroidne žlezde sagledana je na reprezentativnom broju uzoraka u četiri različite patologije. Pronađeno je da je sadržaj Se u zdravom tiroidnom tkivu (ZTT) bio značajno smanjen (do čak 15 puta) u poređenju sa drugim populacionim grupama širom sveta, čime bi mogla da se istakne deficijencija selena u ispitivanoj grupi srpske populacije. Utvrđeno je da patološka tiroidna tkiva imaju značajno izmenjen sadržaj metala u poređenju sa kontrolnom grupom i da svaka tiroidna patologija ima svoj (jedinstveni) profil metala. Najpromenljiviji sadržaj metala zabeležen je u tkivima pacijenata sa Hašimotovim tiroiditisom. Suprotno, najveća sličnost u sadržaju metala sa kontrolnom grupom zabeležena je u tkivima sa BT. Deficit selena bio je karakterističan za svaku tiroidnu patologiju, sa najmanjem vrednostima u malignim tumorima. Arsen se pokazao najznačajnijim elementom u razdvajanju tkiva Hašimotovog tiroiditisa od kontrole, Pb u razdvajanju tkiva sa koloidnom strumom od kontrole i Cd u razdvajanju papilarnog karcinoma od kontrole. Utvrđeno je da nodusi manjeg prečnika sadrže povećan sadržaj nikla, što bi mogao da bude značajan podatak za razmatranje Ni kao potencijalnog inicijatora patogeneze koloidne strume. Utvrđena negativna korelacija između Pb i Se u tkivima sa koloidnom strumom i između Cd i Se u papilarnim tiroidnim tkivima mogla bi da objasni istiskivanje selena iz tkiva sa koloidnom strumom pod uticajem povećanog sadržaja Pb (strumogeni efekat), odnosno antagonistički efekat istiskivanja selena iz papilarnog tiroidnog tkiva pod uticajem velikog sadržaja Cd. Pb/Se pokazao se pogodnim markerom za razdvajanje tkiva koloidne strume od kontrole, dok se Cd/Se pokazao pogodnim markerom za razdvajanje papilarnog karcinoma od kontrole. Najveće vrednosti sadržaja Cd zabeležene su u T1 stadijumu bolesti papilarnog karcinoma tiroidne žlezde, što bi moglo da ukaže na njegov značaj u inicijaciji kancerogeneze. Jedino je povećan sadržaj Cd i Cd/Se imao uticaj na retrosternalnost, dok je smanjen sadržaj dva esencijalna metala (Mn i Zn) imao uticaj na razdvajanje papilarnog tkiva sa prisutnom invazijom od tkiva bez invazije tiroidne kapsule. Dobijeni rezultati u ovoj studiji mogli bi da, po prvi put, pruže informacije o molekulskoj osnovi metalomskih patofizioloških promena ispitivane bolesti tiroidee na tkivnom nivou i rasvetle nedovoljno proučenu etiologiju

tiroidnih bolesti. Takođe, ova studija pruža pouzdane informacije o sadržaju dva radioaktivna metala (Th i U) u tkivu tiroidne žlezde nakon bombardovanja Srbije 1999. godine.

7. REFERENCE

- [1] A.C. Guyton, J.E. Hall, Textbook of medical physiology, eleventh ed., Elsevier Inc., Philadelphia, 2006.
- [2] C.A. Burtis, E.R. Ashwood, D.E. Bruns, Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, fifth ed., Elsevier Saunders, St. Louis, 2012.
- [3] G.D. Hammer, S.J. McPhee, Pathophysiology of disease: an introduction to clinical medicine, seventh ed., McGraw-Hill Education, New York, 2014.
- [4] D. Shier, J. Butler, R. Lewis, Hole's essentials of human anatomy & physiology, thirteenth ed., McGraw-Hill Education, New York, 2018.
- [5] K.E. Barrett, S.M. Barman, S. Boitano, H.L. Brooks, Ganong's review of medical physiology, twentyfifth ed., McGraw-Hill Education, New York, 2016.
- [6] N.V. Bhagavan, C.E. Ha, Essentials of medical biochemistry with clinical cases, second ed., Elsevier Inc., San Diego, 2015.
- [7] G.J. Tortora, B. Derrickson, Principles of anatomy & physiology, fourteenth ed., John Wiley & Sons, Inc., Danvers, 2014.
- [8] M.A. Crook, Clinical biochemistry & metabolic medicine, eighth ed., Hodder Arnold, London, 2012.
- [9] A.A. Oliveira, L.C. Trevizan, J.A. Nobrega, Iodine determination by inductively coupled plasma spectrometry, Appl. Spectros. Rev. 45 (2010) 447–73.
- [10] X. Hou, W. Ding, Isotopes of iodine in thyroid and urine: source, application, level and determination, in: V. Preedy, G. Burrow, R. Watson (Eds.), Comprehensive handbook of iodine, Elsevier Inc., London, 2009, pp. 437–449.

- [11] A. Blazewicz, M. Klatka, W. Dolliver, R. Kocjan, Determination of total iodine in serum and urine samples by ion chromatography with pulsed amperometric detection - studies on analyte loss, optimization of sample preparation procedures, and validation of analytical method, *J. Chromatog. B* 962 (2014) 141–146.
- [12] A. Blazewicz, A review of spectrophotometric and chromatographic methods and sample preparation procedures for determination of iodine in miscellaneous matrices, in: J. Uddin (Ed.), *Macro to nano spectroscopy*, IntechOpen, London, 2012, pp. 371–398.
- [13] P. Allain, S. Berre, N. Krari, P. Laine-Cessac, L.A. Bouil, N. Barbot, V. Rohmer, J.C. Bigorgne, Use of plasma iodine assay for diagnosing thyroid disorders. *J. Clin. Pathol.* 46 (1993) 453–455.
- [14] Lj.T. Đilas, I. Bajkin, T. Ičin, J.N. Paro, B.K. Zavišić, Jod i štitasta žlezda, sa nuklearnim katastrofama i bez njih, *Med. Pregl.* 65 (2012) 489–495.
- [15] T.T. Zava, S. Kapur, D.T. Zava, Iodine and creatinine testing in urine dried on filter paper, *Anal. Chim. Acta* 764 (2013) 64–69.
- [16] O.P. Soldin, Iodine status reflected by urinary concentrations: comparison with the USA and other countries, in: V. Preedy, G. Burrow, R. Watson (Eds.), *Comprehensive handbook of iodine*, Elsevier Inc., London, 2009, pp. 1129–1139.
- [17] F. Soriguer, E. Garcia-Fuentes, C. Gutierrez-Repiso et al., Iodine intake in the adult population, *Clin. Nutr.* 31 (2012) 882–888.
- [18] C.P. Shelor, P.K. Dasgupta, Review of analytical methods for the quantification of iodine in complex matrices. *Anal. Chim. Acta* 702 (2011) 16–36.
- [19] A. Gaw, M.J. Murphy, R. Srivastava, R.A. Cowan, D. S.J. O'Reilly, *Clinical biochemistry: an illustrated colour text*, fifth ed., Elsevier Ltd., Edinburgh, 2013.

- [20] M. Haldimann, B. Zimmerli, C. Als, H. Gerber, Direct determination of urinary iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry using isotope dilution with iodine-129. *Clin. Chem.* 44 (1998) 817–824.
- [21] D. Jović, S. Ćirić, Z. Anđelković, T. Knežević, B. Trbojević, Sprovođenje jodne profilakse u R. Srbiji - trenutno stanje, *Med. Glasnik* 1 (2010) 43–47.
- [22] Institute of Public Health of Serbia, National survey of the biological impact of universal salt iodisation. Available at URL: http://kan-kaz.org/english/files/salt_iodisation_serbia2007.pdf.
- [23] S. Fast, V.E. Nielsen, S.J. Bonnema, L. Hegedus, Time to reconsider nonsurgical therapy of benign non-toxic multinodular goitre: focus on recombinant human TSH augmented radioiodine therapy, *Eur. J. Endocrinol.* 160 (2009) 517–528.
- [24] D. Fuhrer, A. Bockisch, K.W. Schmid, Euthyroid goiter with and without nodules – diagnosis and treatment, *Dtsch. Arztebl. Int.* 109 (2012) 506–516.
- [25] L. Hegedus, S.J. Bonnema, F.N. Bennedbeak, Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives, *Endocrinol. Rev.* 24 (2003) 102–132.
- [26] A. Frilling, C. Liu, F. Weber, Benign multinodular goiter, *Scan J. Surg.* 93 (2004) 278–281.
- [27] S. Lam, B.H.H. Lang, A review of the pathogenesis and management of multinodular goiter, in: G.D. Soto (Ed.), *Thyroid disorders - focus on hyperthyroidism*, IntechOpen, London, 2014, pp. 25–31.
- [28] M.R. Castro, Multinodular goiter - diagnostic and treatment considerations, *US Endocrinol.* 4 (2008) 107–110.
- [29] R.S. Bahn, M.R. Castro, Approach to the patient with nontoxic multinodular goiter, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) 1202–1212.
- [30] J. Hoang, Thyroid nodules and evaluation of thyroid cancer risk, *Aust. J. Ultrasound Med.* 13 (2010) 33–36.

- [31] F.F.R. Maia, D.E. Zantut-Wittmann, Thyroid nodule management: clinical, ultrasound and cytopathological parameters for predicting malignancy, *Clinics* 67 (2012) 945–954.
- [32] M.A. Knox, Thyroid nodules, *Amer. Fam. Physician* 88 (2013) 193–196.
- [33] S.H. Golden, K.A. Robinson, I. Saldanha, B. Anton, P.W. Ladenson, Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 1853–1878.
- [34] P.N. Taylor, D. Albrecht, A. Scholz, G. Gutierrez-Buey, J.H. Lazarus, C.M. Dayan, O.E. Okosieme, Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism, *Nat. Rev. Endocrinol.* 14 (2018) 301–316.
- [35] G. Brenta, M. Vaisman, J.A. Sgarbi, L. M. Bergoglio, N.C. Andrada, P.P. Bravo, A.M. Orlandi, H. Graf, Clinical practice guidelines for the management of hypothyroidism, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 57 (2013) 265–298.
- [36] O.M. Ahmed, R.G. Ahmed, Hypothyroidism, in: D. Springer (Ed.), *A new look at hypothyroidism*, InTechOpen, London, 2012, pp. 3–20.
- [37] G.R. Burmester, A. Pezzutto, *Color atlas of immunology*, first ed., Thieme Stuttgart, New York, 2003.
- [38] S.D. Leo, S.Y. Lee, L.E. Braverman, Hyperthyroidism, *Lancet* 388 (2016) 906–918.
- [39] I. Kravets, Hyperthyroidism: diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician.* 93 (2016) 363–370.
- [40] P. Fard-Esfahani, D. Beiki, B. Fallahi, A. Fard-Esfahani, A. Emami-Ardekani, M. Ansari, M. Eftekhari, Radioiodine therapy for hyperthyroidism, *Iran. J. Nucl. Med.* 19 (2011) 1–12.
- [41] J. Lindholm, P. Laurberg, Hyperthyroidism, exophthalmos, and goiter: historical notes on the orbitopathy, *Thyroid* 20 (2010) 291–300.
- [42] S. Fung, R. Malhotra, D. Selva, Thyroid orbitopathy, *Am. Fam. Physician.* 32 (2003) 615–620.

- [43] G. Dom, S. Frank, S. Floor, P. Kehagias, F. Libert, C. Hoang, G. Andry, A. Spinette, L. Craciun, N.S. Aubin, C. Tresallet, F. Tissier, F. Savagner, S. Majjaj, I. Gutierrez-Roelens, E. Marbaix, J.E. Dumont, C. Maenhaut, Thyroid follicular adenomas and carcinomas: molecular profiling provides evidence for a continuous evolution, *Oncotarget* 9 (2017) 10343–10359.
- [44] J.R. Janković, Analiza proteinskih i genetičkih biomarkera u preoperativnoj i postoperativnoj diferencijalnoj dijagnostici tumora štitaste žlezde, Doktorska disertacija, 2016, Beograd.
- [45] B. Czerny, K. Krupka, M. Ozarowski, A. Seremak-Mrozikiewicz, Screening of trace elements in hair of the female population with different types of cancers in Wielkopolska region of Poland, 2014, *Sci. World J.* ID 953181, 1–15.
- [46] E.O. Bursalioglu, F.A. Alkan, U.B. Baratu, M. Demir, Y. Karabul, B. Balkan, E. Oz, O. Icelli, Prediction of electron density and trace element concentrations in human blood serum following radioiodine therapy in differentiated thyroid cancer patients, *Measurements* 100 (2017) 19–25.
- [47] S.J. Mulware, Comparative trace elemental analysis in cancerous and noncancerous human tissues using PIXE, *J. Biophysics*, 2013, ID 192026, 1–8.
- [48] H.S. Kim, Y.J. Kim, Y.R. Seo, An overview of carcinogenic heavy metal: molecular toxicity mechanism and prevention, *J. Cancer Preven.* 20 (2015) 232–240.
- [49] G. Kaya, H. Avci, I. Akdeniz, M. Yaman, Determination of trace and minor metals in benign and malign human thyroid tissue, *Asian J. Chem.* 21 (2009) 5718–5726.
- [50] S. Wang, X. Shi, Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis, *Mol. Cell. Biochem.* 222 (2001) 3–9.
- [51] A. Blazewicz, W. Dolliver, S. Sivsammie, A. Deol, R. Randhwava, G. Orlicz-Szczesna, R. Blazewicz, Determination of cadmium, cobalt, copper, iron, manganese, and zinc in thyroid

glands of patients with diagnosed nodular goitre using ion chromatography, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 34–38.

[52] F. Pacini, M.G. Castagna, L. Brilli, G. Pentheroudakis, Thyroid cancer: EMSO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann. Oncol.* 23 (2012) 110–119.

[53] H. Katoh, K. Yamashita, T. Enomoto, M. Watanabe, Classification and general considerations of thyroid cancer, *Ann. Clin. Pathol.* 3 (2015) 1–9.

[54] P. Malandrino, C. Scollo, I. Marturano, M. Russo, M. Tavarelli, M. Attard, P. Richiusa, M.A. Violi, G. Dardanoni, R. Vigneri, G. Pellegriti, Descriptive epidemiology of human thyroid cancer: experience from a regional registry and the „volcanic factor“, *Front. Endocrinol.* 4 (2013) 1–7.

[55] F. Hussain, S. Iqbal, A. Mehmood, S. Bazarbashi, T. ElHassan, N. Chaudhri, Incidence of thyroid cancer in the Kingdom of Saudi Arabia, 2000-2010. *Hematol. Oncol. Stem Cell. Ther.* 6 (2013) 58–64.

[56] N.N. Howlader, A.M. Krapcho, M. Garshell, J. Neyman, N. Altekruse, S.F. Kosary, C.L. Yu, M. Ruhl, J. Tatalovich, Z. Cho, H. Mariotto, A. Lewis, D.R. Chen, H.S. Feuer, E.J. Cronin, K.A. SEER Cancer Statistics Review, Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1975-2010, 2013.

[57] G.L. Copeland, A. Firth, R. Wohler, B. Wu, X.C. Schymura, M. Hofferkamp, J. Sherman, R. Kohler, Cancer in North America: 2008-2012. Volume One: Combined cancer for the United States, Canada and North America, Springfield, IL: North American Association of Central Cancer Registries, 2015.

[58] M.A. Marcello, P. Malandrino, J.F.M. Almeida, M.B. Martins, L.L. Cunha, N.E. Bufalo, G. Pellegriti, L.S. Ward, The influence of the environment on the development of thyroid tumors: a new appraisal, *Endocr-Relat. Cancer* 21 (2014) 235–254.

- [59] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J.W.W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012, *Eur. J. Cancer* 49 (2013) 1374–1403.
- [60] N. Slijepcevic, V. Zivaljevic, I. Paunovic, A. Diklic, S.Z. Perisic, D. Miljus, A. Grgurevic, S. Sipetic, Rising incidence of thyroid cancer in Serbia. *Hippokratia* 20 (2016) 9–13.
- [61] G. Pellegriti, F. Frasca, C. Regalbuto, S. Squatrito, R. Vigneri, Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors, *J. Cancer Epidemiol.* 2013, ID 965212, 1–10.
- [62] B.R. Rovčanin, Analiza oksidativnog stresa u tkivu papilarnog karcinoma štitaste žlezde, Doktorska disertacija, 2017, Beograd.
- [63] S. Knežević-Ušaj, Ž. Eri, M. Panjković, I. Klem, T. Petrović, T. Ivković-Kapicl, A. Karapandžić, J. Jelić, Dijagnostička pouzdanost citoloških nalaza nodularnih lezija štitaste žlezde iz uzoraka dobijenih aspiracijom tankom iglom, *Vojnosanit. Pregl.* 69 (2012) 555–561.
- [64] B. Schmidbauer, K. Menhart, D. Hellwig, J. Grosse, Differentiated thyroid cancer-treatment: state of the art, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1–17.
- [65] C.R. McHenry, R. Phitayakorn, Follicular adenoma and carcinoma of the thyroid gland, *Oncologist*, 16 (2011) 585–593.
- [66] I. Paunović, Hirurška terapija karcinoma štitaste žlezde, DOI: 10.5644/PI2016.167.08.
- [67] N. Curcin, O. Mihajlović, I. Jeftić, I. Kostić, A. Djukic, S.Z. Simonovic, Diferentovani karcinomi štitaste žlezde - epidemiologija, etiopatogeneza, dijagnostika i terapijske smernice, *Med. Čas.* 49 (2014) 93–97.
- [68] A. Diklić, Savremeno hirurško lečenje diferentovanih malignih tumora štitaste žlezde – šta smo postigli u toku poslednje dve decenije, *Med. Glas.* 32–44.

- [69] J.A. Fagin, S.A. Wells Jr, Biological and clinical perspectives on thyroid cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 1054–1067.
- [70] H.J. Biersack, F. Grünwald, *Thyroid Cancer*, second ed., Springer-Verlag, Berlin, 2005.
- [71] X. Nie, Z. Tan, M. Ge, Skip metastasis in papillary thyroid carcinoma is difficult to predict in clinical practice, *BMC Cancer* 17 (2017) 1–8.
- [72] A.R. Puchalski, I.J. Chopra, Radioiodine treatment of differentiated thyroid cancer despite history of „iodine allergy“, *EDM Case Reports*, 2014, ID 13-0084, 1–3.
- [73] E.L. Mazzaferri, Management of low risk differentiated thyroid cancer, *Endocr. Pract.* 13 (2007) 498–512.
- [74] Dž. Davor, *Kliničko-patološke osobitosti papilarnog mikrokarcinoma štitnjače*, Doktorska disertacija, 2010, Zagreb.
- [75] M. Podda, A. Saba, F. Porru, I. Reccia, A. Pisanu, Follicular thyroid carcinoma: differences in clinical relevance between minimally invasive and widely invasive tumors, *World J. Surg. Oncol.* 13 (2015) 1–7.
- [76] P. Piromchai, T. Ratanaanekchai, P. Kasemsiri, Diagnosis and treatment of anaplastic thyroid carcinoma, *Inter. J. Clin. Med.* 3 (2012) 63–73.
- [77] A. Pinchera, R. Elisei, Medullary thyroid cancer: diagnosis and management, in: E.L. Mazzaferri, C. Harmer, U.K. Mallick, P. Kendall-Taylor (Eds.), *Practical management of thyroid cancer*, Springer-Verlag, London, 2006, pp. 255–279.
- [78] K. Cupisti, A. Wolf, A. Raffel, M. Schott, D. Miersch, Q. Yang, C.F. Eisenberger, H.D. Roher, W.T. Knoefel, Long-term clinical and biochemical follow-up in medullary thyroid carcinoma, *Ann. Surg.* 246 (2007) 815–821.

- [79] D. Hong, L. Ye, R. Gagel, L. Chintala, A.K.E. Naggar, J. Wright, R. Kurzrock, Medullary thyroid cancer: targeting the RET kinase pathway with sorafenib/tipifarnib, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 1001–1006.
- [80] A. Machens, K. Lorenz, H. Dralle, Progression of medullary thyroid cancer in RET carriers of ATA class A and C mutations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) 286–292.
- [81] D. Stojanović, I. Paunović, Z. Čaparević, Đ. Lalošević, M. Stojanović, Totalna tiroidektomija zbog hiperplazije C-ćelija tiroidne žlezde, *Med. Pregl.* 66 (2003) 481–484.
- [82] Y.F. Li, C. Chen, Y. Qu, Y. Gao, B. Li, Y. Zhao, Z. Chai, Metallomics, elementomics, and analytical techniques, *Pure Appl. Chem.* 12 (2008) 2577–2594.
- [83] I. Rodushkin, F. Odman, Assessment of the contamination from devices used for sampling and storage of whole blood and serum for element analysis. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15 (2001) 40–45.
- [84] P. Avino, G. Capannesi, M. Manigrasso, E. Sabbioni, A. Rosada, Element assessment in whole blood, serum and urine of three Italian healthy sub-populations by INAA, *Microchem. J.* 99 (2011) 548–555.
- [85] G.H.O. Rocha, C. Steinbach, J.R. Munhoz, M.A.O. Madia, J.K. Faria, D. Hoeltgebaum, F. Barbosa Jr, B.L. Batista, V.C.O. Souza, S.B. Nerilo, E. Bando, S.A.G. Mossini, P. Nishiyama, Trace metal levels in serum and urine of a population in southern Brazil, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 35 (2016) 61–65.
- [86] B. Yedomon, A. Menudier, F.L.D. Etangs, L. Anani, B. Fayomi, M. Druet-Cabanac, C. Moesch, Biomonitoring of 29 trace elements in whole blood from inhabitants of Cotonou (Benin) by ICP-MS, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 43 (2017) 38–45.
- [87] H.J. Choi, S.J. Lim, Y.S. Park, S.Y. Lee, Simple and robust ICP-MS method for simultaneous determination of serum Co and Cr in routine clinical practice, *Clin. Chim. Acta* 439 (2015) 91–96.

- [88] K. Chojnacka, M. Mikulewicz, Biomarkers of trace element status, in: K. Chojnacka, A. Saeid (Eds.), *Recent advances in trace elements*, Wiley & Sons Ltd., 2018, pp. 457–467.
- [89] A. Alimonti, F. Petrucci, F. Laurenti, P. Papoff, S. Caroli, Reference values for selected trace elements in serum of term newborns from the urban area of Rome, *Clin. Chim. Acta* 292 (2000) 163–173.
- [90] A. Alimonti, B. Bocca, E. Mannella, F. Petrucci, F. Zennaro, R. Cotichini, C. D’Ipplito, A. Agresti, S. Caimi, G. Forte, Assessment of reference values for selected elements in a healthy urban population, *Ann. Ist. Super Sanita* 41 (2005) 181–187.
- [91] S. Caroli, G. Zaray, *Analytical techniques for clinical chemistry methods and applications*, first ed., Hoboken, 2012.
- [92] H. Matusiewicz, Wet digestion methods, *Comprehensive Analytical Chemistry* 41 (2003) 193–233.
- [93] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, P. Pohl, Quality of the trace element analysis: sample preparation steps, in: I. Akyar (Ed.), *Wide spectra of quality control*, InTechOpen, 53–70.
- [94] S. Hill, *Inductively coupled plasma spectrometry and its applications*, second ed., Oxford, UK, 2007.
- [95] J.R. Dean, *Practical inductively coupled plasma spectroscopy*, first ed., West Sussex, England, 2005.
- [96] X. Hou, S.R. Amais, B.T. Jones and L.G. Donati, Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, in: X. Hou, B.T. Jones (Eds.), *Encyclopedia of analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2016, pp: 1–25.
- [97] R. Thomas, *Practical guide to ICP-MS*, second ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, US, 2008.
- [98] A.A. Ammann, Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 419–427.

- [99] J.P. Goulle, E. Saussereau, L. Mahieu, M. Guerbet, Current role of ICP-MS in clinical toxicology and forensic toxicology: a metallic profile, *Bioanalysis* 6 (2014) 2245–2259.
- [100] H.J. Finley-Jones, J.L. Molloyx, J.A. Holcombe, Choosing internal standards based on a multivariate analysis approach with ICP(TOF)MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1214–1222.
- [101] B. Georgescu, C. Georgescu, S. Daraban, A. Bouaru, S. Pascalau, Heavy metals acting as endocrine disrupters, *Anim. Sci. Biotech.* 44 (2011) 89–93.
- [102] V.Y. Zaichick, A.F. Tsyb, B.M. Vtyurin, Trace elements and thyroid cancer, *Analyst* 120 (1995) 817–821.
- [103] I.C. Nettore, A. Colao, P.E. Macchia, Nutritional and environmental factors in thyroid carcinogenesis, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15 (2018) 1–11.
- [104] Human vitamin and mineral requirements: report of a joint WHO/FAO Expert Committee, World Health Organization/Food and Agricultural Organisation, Rome, WHO/FAO, 2002, pp. 235–255.
- [105] M. Kucharzewski, J. Braziewicz, U. Majewska, S. Gozdz, Concentration of selenium in the whole blood and the thyroid tissue of patients with various thyroid diseases. *Biol. Trace Elem. Res.* 88 (2002) 25–30.
- [106] V. Zaichick, S. Zaichick, Associations between age and 50 trace element contents and relationships in intact thyroid of males, *Aging Clin. Exp. Res.* 30 (2018) 1059–1070.
- [107] A.K. Baltaci, T.K. Dundar, F. Aksoy, R. Mogulkoc, Changes in the serum levels of trace elements before and after the operation in thyroid cancer patients, *Biol. Trace Elem. Res.* 175 (2017) 57–64.
- [108] L.R. Santos, C. Neves, M. Melo, P. Soares, Selenium and selenoproteins in immune mediated thyroid disorders, *Diagnostics* 8 (2018) pii: E70.

- [109] W. Wasowicz, J. Gromadzinska, K. Rydzynski, J. Tomczak, Selenium status of low-selenium area residents: Polish experience, *Toxicol. Lett.* 137 (2003) 95–101.
- [110] M.R. Kafai, V. Ganji, Sex, age, geographical location, smoking, and alcohol consumption influence serum selenium concentrations in the USA: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 17 (2003) 13–18.
- [111] V. Ermakov, L. Jovanović, Selenium deficiency as a consequence of human activity and its correction, *J. Geochem. Explor.* 107 (2010) 193–199.
- [112] Z.J. Maksimović, I. Djujić, V. Jović, M. Ršumović, Selenium deficiency in Yugoslavia, *Biol. Trace Elem. Res.* 33 (1992) 187–196.
- [113] A. Drutel, F. Archambeaud, P. Caron, Selenium and the thyroid gland: more good news for clinicians, *Clin. Endocrinol.* 78 (2013) 155–164.
- [114] C.H. Chen, J.S. Lai, C.C. Wu, T.S. Lin, Serum selenium in adult Taiwanese, *Sci. Total Environ.* 367 (2006) 448–450.
- [115] Z. Maksimović, M. Rsumović, V. Jović, M. Kosanović, T. Jovanović, Selenium in soil, grass, and human serum in the Zlatibor mountain area (Serbia): geomedical aspects, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 17 (1998) 221–227.
- [116] Z. Pavlović, I. Miletić, Ž. Jokić, J. Stevanović, S. Šobajić, Z. Bulat, The influence of selenium supplementation of animal feed on human selenium intake in Serbia, *Biotech. Animal Husb.* 29 (2013) 345–352.
- [117] L.H. Duntas, P.P.A. Smyth, Selenoproteins and thyroid cancer, in: J. Liu et al. (Eds.), *Selenoproteins and Mimics*, Zhejiang University Press, 2011, pp. 173–182.
- [118] Y. Suzuki, Y. Hashiura, K. Matsumura, T. Matsukawa, A. Shinohara, N. Furuta, Dynamic pathways of selenium metabolism and excretion in mice under different selenium nutritional statuses, *Metallomics* 2 (2010) 126–132.

- [119] M. Ventura, M. Melo, F. Carrlho, Selenium and thyroid disease: from pathophysiology to treatment, *Int. J. Endocrinol.* 2017, ID 129658, 1–9.
- [120] J. Kohrle, Selenium and the thyroid, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 22 (2015) 392–401.
- [121] J.R. Arthur, G.J. Beckett, Thyroid function, *Brit. Med. Bull.* 55 (1999) 658–668.
- [122] Y. Xia, K.E. Hill, P. Li, J. Xu, D. Zhou, A.K. Motley, L. Wang, D.W. Byrne, R.F. Burk Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: a placebo-controlled, double-blind study of selenomethionine supplementation in selenium-deficient Chinese subjects, *Am. J. Clin. Nutr.* 92 (2010) 525–531.
- [123] A. Stojšavljević, J. Trifković, Z. Rašić-Milutinović, D. Jovanović, G. Bogdanović, J. Mutić, D. Manojlović, Determination of toxic and essential trace elements in serum samples of healthy and hypothyroid respondents by ICP-MS: A chemometric approach for discrimination of hypothyroidism, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 48 (2018) 134–140.
- [124] A. Khubchandani, V. Parmar, V. Solanki, J. Jadav, A. Gamit, S. Gangwani, Comparison of serum zinc and serum copper in hypothyroid patients with normal subjects, *Int. J. Res. Med.* 3 (2014) 1–3.
- [125] S. Baloch, A.R. Memon, A.S. Hayat, N. Masood, Evaluation of serum copper and zinc in hypothyroidism patients, *ARPN J. Sci. Tech.* 3 (2013) 316–318.
- [126] F.D. Dellal, M. Niyazoglu, E. Ademoglu, S. Gorar, Z. Candan, H. Bekdemir, Z.A. Uc, M. Senes, A. Ozderya, Y. Aral, Evaluation of serum trace elements and vitamin levels in Hashimoto's thyroiditis: single centre experience from Turkey, *OJEMD*, 3 (2013) 236–240.
- [127] M. Erdal, M. Sahin, A. Hasimi, G. Uckaya, M. Kutlu, K. Saglam, Trace element levels in Hashimoto thyroiditis patients with subclinical hypothyroidism, *Biol. Trace Elem. Res.* 123 (2008) 1–7.

- [128] E. Przybylik-Mazurek, P. Zagrodzki, S. Kuzniarz-Rymarz, Thyroid disorders-assessments of trace elements, clinical and laboratory parameters, *Biol. Trace Elem. Res.* 141 (2011) 65–75.
- [129] Y.S. Hong, K.H. Song, J.Y. Chung, Health effects of chronic arsenic exposure, *J. Prev. Med. Public Health*, 47 (2014) 245–252.
- [130] N. Singh, D. Kumar, A.P. Sahu, Arsenic in the environment: effects on human health and possible prevention, *J. Environ. Biol.* 28 (2007) 359–365.
- [131] S. Borković-Mitić, S. Pavlović, B. Perendija, S. Despotović, J. Gavrić, Z. Gačić, Z. Saičić, Influence of some metal concentrations on the activity of antioxidant enzymes and concentrations of vitamin E and SH-groups in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* from the Serbian part of Sava River, *Ecol. Indic.* 32 (2013) 212–221.
- [132] D. Jovanović, B. Jakovljević, Z. Rašić-Milutinović, K. Paunović, G. Peković, T. Knežević, Arsenic occurrence in drinking water supply systems in ten municipalities in Vojvodina Region, Serbia, *Environ. Res.* 111 (2011) 315–318.
- [133] B. Stanisavljev, Z. Bulat, A. Buha, V. Matović, Arsenic in drinking water in Northern region of Serbia, *E3S Web of Conferences* 1, 24006, 2013.
- [134] G. Dević, D. Djoković, S. Sakan, Natural and anthropogenic factors affecting the groundwater quality in Serbia, *Sci. Total Environ.* 468 (2014) 933–942.
- [135] D. Jovanovic, Z. Rasic-Milutinovic, K. Paunovic, B. Jakovljevic, S. Plavsic, J. Milosevic, Low levels of arsenic in drinking water and type 2 diabetes in Middle Banat region, Serbia, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216 (2013) 50–55.
- [136] O.P. Soldin, M. Aschner, Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis, *Neurotoxicology* 28 (2007) 951–956.
- [137] B. Giray, J. Arnaud, I. Sayek, A. Favier, F. Hincal, Trace elements status in multinodular goiter, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 24 (2010) 106–110.

- [138] M. Kucharzewski, J. Braziewicz, U. Majewska, S. Gozdz, Copper, zinc, and selenium in whole blood and thyroid tissue of people with various thyroid diseases, *Biol. Trace Elem. Res.* 93 (2003) 9–18.
- [139] K. Jomova, M. Valko, Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology* 283 (2011) 65–87.
- [140] A. Stojšavljević, B. Rovčanin, Đ. Krstić, S. Borković-Mitić, I. Paunović, A. Diklić, M. Gavrović-Jankulović, D. Manojlović, Risk assessment of toxic and essential trace metals on the thyroid health at the tissue level: the significance of lead and selenium for colloid goiter disease, *Expo. Health*, 2019.
- [141] H.J. Kim, H.S. Lim, K.R. Lee, M.H. Choi, N.M. Kang, C.H. Lee, E.J. Oh, H.K. Park, Determination of trace metal levels in the general population of Korea, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14 (2017) 1–12.
- [142] A.I. Canas, M. Cervantes-Amat, M. Esteban, M. Ruiz-Moraga, B. Perez-Gomez, J. Mayor, A. Castano, Blood lead levels in a representative sample of the Spanish adult population: the BIOAMBIENT.ES project, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217 (2014) 452–459.
- [143] G. Forte, R. Madeddu, P. Tolu, Y. Asara, J.A. Marchal, B. Bocca, Reference intervals for blood Cd and Pb in the general population of Sardinia (Italy), *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214 (2011) 102–109.
- [144] K. Becker, S. Kaus, C. Krause, P. Lepom, C. Schulz, M. Seiwert, B. Seifert, German environmental survey 1998 (GerES III): environmental pollutions in blood of the German population, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205 (2002) 297–308.
- [145] A. Stojšavljević, S. Borković-Mitić, Lj. Vujotić, D. Grujičić, M. Gavrović-Jankulović, D. Manojlović, The human biomonitoring study in Serbia: background levels for arsenic, cadmium, lead, thorium and uranium in the whole blood of the adult Serbian population, *Ecotox. Environ. Safety* 169 (2019) 402–409.

- [146] R. Zhang, V.L. Wilson, A. Hou, G. Meng, Source of lead pollution, its influence on public health and the countermeasures, *Int. J. Health, Animal science and Food safety* 2 (2015) 18–31.
- [147] M.A. Nouioui, M. Araoud, M.L. Milliand, F. Bessueille-Barbier, D. Amira, L. Ayouni-Derouiche, A. Hedhili, Biomonitoring chronic lead exposure among battery manufacturing workers in Tunisia, *Environ. Sci. Poll. Res.* 2019.
- [148] M. Wilhelm, U. Ewers, C. Schulz, Revised and new reference values for some trace elements in blood and urine for human biomonitoring in environmental medicine, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207 (2004) 69–73.
- [149] K. Lazarević, D. Nikolić, Lj. Stošić, S. Milutinović, J. Videnović, D. Bogdanović, Determination of lead and arsenic in tobacco and cigarettes: an important issue of public health, *Cent. Eur. J. Public Health* 20(2012) 62–66.
- [150] B. Skrbić, J. Živančev, N. Mrmoš, Concentrations of arsenic, cadmium and lead in selected foodstuffs from Serbian market basket: estimated intake by the population from the Serbia, *Food Chem. Toxicol.* 58 (2013) 440–448.
- [151] S. Sakan, D. Đorđević, G. Dević, D. Relić, I. Anđelković, J. Đuričić, A study of trace element contamination in river sediments in Serbia using microwave-assisted aqua regia digestion and multivariate statistical analysis, *Microchem. J.* 99 (2011) 492–502.
- [152] A. Sahin, H. Iskender, K.A.T. Kapakin, K. Altinkaynak, A. Hayirli, A. Gonultas, O. Kaynar, The effect of humic acid substances on the thyroid function and structure in lead poisoning, *Braz. J. Poul. Sci.* 18 (2016) 649–654.
- [153] O.V. Savchenko, P.A. Toupeleev, Lead, cadmium, manganese, cobalt, zinc and copper levels in whole blood of urban teenagers with non-toxic diffuse goiter, *Int. J. Environ. Health Res.* 22 (2012) 51–59.
- [154] B. Lasisz, Z. Zdrojewicz, Z. Marcinkowski, Effect of lead on thyroid function, *Wiad Lek* 45 (1992) 116–119.

- [155] K. Badiei, P. Nikghadam, K. Mostaghni, M. Zarifi Effect of lead on thyroid function in sheep, Iran. J. Vet. Res. 10 (2009) 223–227.
- [156] B. Dundar, F. Oktem, M.K. Arslan, N. Delibas, B. Baykal, C. Arslan, M. Gultepe, I.E. Ilhan, The effect of long-term low-dose lead exposure on thyroid function in adolescents, Environ. Res. 101 (2006) 140–145.
- [157] A. Gustafson, P. Hedner, A. Schutz, S. Skerfving, Occupational lead exposure and pituitary function, Int. Arch. Occup. Environ. Health 61 (1989) 277–281.
- [158] E. Barany, I.A. Bergdahl, L.E. Bratterby, T. Lundh, G. Samuelson, A. Schutz, S. Skerfving, A. Oskarsson, Relationship between trace element concentrations in human blood and serum, Toxicol. Lett. 134 (2002) 177–184.
- [159] U. Majewska, J. Braziewicz, D. Banas, A. Kubala-Kukus, M. Kucharzewski, J. Waler, S. Gozdz, J. Wudarczyk, Zn concentration in thyroid tissue and whole blood of women with different disease of thyroid, Biol. Trace Elem. Res. 80 (2001) 193–199.
- [160] S.B. Reddy, M.J. Charles, M.R. Kumar, B.S. Reddy, C. Anjaneyulu, G.J.N. Raju, B. Schmidbauer, K. Menhart, D. Hellwing, J. Grosse, Differentiated thyroid cancer-treatment: state of the art, Int. J. Mol. Sci. 18 (2017) 1–17.
- [161] M. Yaman, I. Akdeniz, Sensitivity enhancement in flame atomic absorption spectrometry for determination of copper in human thyroid tissues, Anal. Sci. 20 (2004) 1363–1366.
- [162] S.J. Mulware, Comparative trace elemental analysis in cancerous and noncancerous human tissues using PIXE, J. Biophysics 1 (2013) 1–8.
- [163] J. Gumulec, M. Masarik, V. Adam, T. Eckschlager, I. Provaznik, R. Kizek, Serum and tissue zinc in epithelial malignancies: a meta-analysis, Plos One 9 (2014) 1–11.
- [164] A. Chen, S.S. Kim, E. Chung, K.N. Dietrich, Thyroid hormones in relation to lead, mercury, and cadmium exposure in the national health and nutrition examination survey, 2007–2008, Environ. Health Perspect. 121 (2013) 181–186.

- [165] R. Kuno, M.H. Roquetti, K. Becker, M. Seiwert, N. Gouveia, Reference values for lead, cadmium and mercury in the blood of adults from the metropolitan area of Sao Paulo, Brazil, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216 (2013) 243–249.
- [166] A. Buha, V. Matovic, B. Antonijevic, Z. Bulat, M. Curcic, E.A. Renieri, A.M. Tsatsakis, A. Schweitzer, D. Wallace, Overview of cadmium thyroid disrupting effects and mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1–19.
- [167] C. Freire, R.J. Koifman, D. Fujimoto, V.C.O. Souza, F. Barbosa Jr, S. Koifman, Reference values of cadmium, arsenic and manganese in blood and factors associated with exposure levels among adult population of Rio Branco, Acre, Brazil, *Chemosphere*, 128 (2015) 70–78.
- [168] R. Khlifi, P. Olmedo, F. Gil, M. Feki-Tounsi, B. Hammami, A. Rebai, A. Hamza-Chaffai, Biomonitoring of cadmium, chromium, nickel and arsenic in general population living near mining and active industrial areas in Southern Tunisia, *Environ. Monit. Assess.* 186 (2014) 761–779.
- [169] W. Baeyens, J. Vrijens, Y. Gao, K. Croes, G. Schoeters, E.D. Hond, I. Sioen, L. Bruckers, T. Nawrot, V. Nelen, E.V.D. Mierop, B. Morrens, I. Loots, N.V. Larebeke, M. Leermakers, Trace metals in blood and urine of newborn/mother pairs, adolescents and adults of the Flemish population (2007-2011), *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217 (2014) 878–890.
- [170] M. Černa, A. Krskova, M. Čejchanova, V. Spevačková, Human biomonitoring in the Czech Republic: an overview, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 215 (2012) 109–119.
- [171] F. Gil, A.F. Hernandez, C. Marquez, P. Femia, P. Olmedo, O. Lopez-Guarnido, A. Pla, Biomonitoring of cadmium, chromium, manganese, nickel and lead in whole blood, urine, axillary hair and saliva in an occupationally exposed population, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 1172–1180.
- [172] C. Nisse, R. Tagne-Fotso, M. Howsam, C. Richeval, L. Labat, A. Leroyer, Blood and urinary levels of metals and metalloids in the general adult population of Northern France: the IMEPOGE study, 2008-2010, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 220 (2017) 341–363.

- [173] J.A. Nunes, B.L. Batista, J.L. Rodrigues, N.M. Caldas, J.A. Neto, F. Barbosa Jr, A simple method based on ICP-MS for estimation of background levels of arsenic, cadmium, copper, manganese, nickel, lead, and selenium in blood of the Brazilian population, *J. Toxicol. Environ. Health A* 73 (2010) 878–887.
- [174] M.U. Ali, G. Liu, B. Yousaf, H. Ullah, Q. Abbas, M.A.M. Munir, S. Irshad, Biomonitoring and health risks assessment of trace elements in various age- and gender-groups exposed to road dust in habitable urban-industrial areas of Hefei, China, *Environ. Poll.* 244 (2019) 809–817.
- [175] S. Satarug, M.R. Moore, Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke, *Environ. Health Persp.* 112 (2004) 1099–1103.
- [176] S.A. Jancic, B.Z. Stosic, Cadmium effects on the thyroid gland, in: Litwack, G. (Ed.), *Vitamins and Hormones*, 2014. pp. 391–425.
- [177] V. Petrosino, G. Motta, G. Tenore, M. Coletta, A. Guarglia, D. Testa, The role of heavy metals and polychlorinated biphenyls (PCBs) in the oncogenesis of head and neck tumors and thyroid disease: a pilot study, *Biometals* 31 (2018) 285–295.
- [178] F. Shen, W.S. Cai, J.L. Li, Z. Feng, J. Cao, B. Xu, The association between serum levels of selenium, copper, and magnesium with thyroid cancer: a meta-analysis, *Biol. Trace Elem. Res.* 167 (2015) 225–235.
- [179] M. Danielsen, H. Wang, A pilot study of serum selenium, vitamin D, and thyrotropin concentrations in patients with thyroid cancer, *Thyroid*, 23 (2013) 1079–1086.
- [180] G. Dennert, M. Zwahlen, M. Brinkman, M. Vinceti, M.P. Zeegers, M. Horneber, Selenium for preventing cancer, *Cochrane Database Syst. Rev.* 11 (2011) CD005195.
- [181] V. Jayaprakash, J.R. Marshall, Selenium and other antioxidants for chemoprevention of gastrointestinal cancers, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25 (2011) 507–518.

- [182] M. Selenius, A.K. Rundlof, E. Olm, A.P. Fernandes, M. Björnstedt, Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer, *Antioxid. Redox Signal.* 12 (2010) 867–880.
- [183] A. Metere, F. Frezzotti, C.E. Graves, M. Vergine, A. De Luca, D. Pietraforte, L. Giacomelli, A possible role for selenoprotein glutathione peroxidase (GPx1) and thioredoxin reductases (TrxR1) in thyroid cancer: our experience in thyroid surgery, *Cancer Cell Int.* 18 (2018) 2–9.
- [184] C. Schmutzler, B. Mentrup, L. Schomburg, C. Hoang-Vu, V. Herzog, J. Kohrle, Selenoproteins of the thyroid gland: expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3, *Bio. Chem.* 388 (2007) 1053–1059.
- [185] J. Kobayashi, K. Ikeda, H. Sugiyama, Cytotoxicity of heavy metals to a thyroid carcinoma cell line, *J. Environ. Anal. Toxicol.* 7 (2017) 1–3.
- [186] H.K. Chung, J.S. Nam, C.W. Ahn, Y.S. Lee, K.R. Kim, Some elements in thyroid tissue are associated with more advanced stage of thyroid cancer in Korean women, *Biol. Trace Elem. Res.* 171 (2016) 54–62.
- [187] K. Zabłocka-Słowińska, S. Płaczkowskab, A. Preschaa, K. Pawełczyk, I. Porębskad, M. Kosackad, L. Pawlik-Sobeckae, H. Grajetaa, Serum and whole blood Zn, Cu and Mn profiles and their relation to redox status in lung cancer patients, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 45 (2018) 78–84.
- [188] M. Waciewicz, K. Socha, J. Soroczyńska, M. Niczyporuk, P. Aleksiejczuk, J. Ostrowska, M.H. Borawska, Concentration of selenium, zinc, copper, Cu/Zn ratio, total antioxidant status and c-reactive protein in the serum of patients with psoriasis treated by narrow-band ultraviolet B phototherapy: A case-control study, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 44 (2017) 109–114.
- [189] H. Yanagisawa, T. Kawashima, M. Miyazawa, T. Ohshiro, Validity of the copper/zinc ratio as a diagnostic marker for taste disorders associated with zinc deficiency, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 36 (2016) 80–83.

- [190] P. Ozturka, E.B. Kurutas, A. Ataseven, Copper/zinc and copper/selenium ratios, and oxidative stress as biochemical markers in recurrent aphthous stomatitis, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 27 (2013) 312–316.
- [191] Z. Hon, J. Osterreicher, L. Navratil, Depleted uranium and its effects on humans, *Sustainability* 7 (2015) 4063–4077.
- [192] M.B. Rajković, Životna sredina i osiromašeni uranijum, *Hem. Ind.* 55 (2001) 295–308.

8. BIOGRAFIJA

Aleksandar (Branko) Stojsavljević rođen je 14.11.1988. godine u Pančevu. Završio je prirodno-matematički smer gimnazije „Uroš Predić“ u Pančevu. Osnovne akademske studije, smer diplomirani biohemičar, završio je 2013. godine na Hemijskom fakultetu, sa prosečnom ocenom 8 i ocenom 10 na završnom radu pod nazivom „Određivanje selen u humanom serumu primenom induktivno spregnute plazme sa masenom spektrometrijom“. Iste godine upisao je master akademske studije na Hemijskom fakultetu u Beogradu, smer master hemičar, koje je završio 2014. godine sa prosečnom ocenom 10 i ocenom 10 na diplomskom radu pod nazivom „Optimizacija metode induktivno spregnute plazme sa masenom spektrometrijom za određivanje tragova i ultra-tragova elemenata u biološkom materijalu“. Školske 2014/15. godine upisao je doktorske akademske studije na Hemijskom fakultetu, studijski program Hemija. Položio je sve planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 10. Od 2018. godine, Aleksandar je zaposlen na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, prvo na mestu istraživač-pripravnik, a od 2019. godine na radnom mestu istraživač-saradnik. Do sada je objavio sedam naučnih radova u međunarodnim časopisima i nekoliko saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Član je Biohemijskog društva Srbije.

Objavljeni radovi i saopštenja koja čine deo disertacije:

M21a – međunarodni časopisi od izuzetnih vrednosti

A. Stojsavljević, B. Rovčanin, Đ. Krstić, S. Borković-Mitić, I. Paunović, A. Diklić, M. Gavrović-Jankulović, D. Manojlović, Risk assessment of toxic and essential trace metals on the thyroid health at the tissue level: the significance of lead and selenium for colloid goiter disease, *Exposure and Health*, DOI: <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00309-9> (IF₂₀₁₇ = 4,850).

M21 – vrhunski međunarodni časopisi

A. Stojsavljević, B. Rovčanin, Đ. Krstić, S. Borković-Mitić, I. Paunović, I. Kodranov, M. Gavrović-Jankulović, D. Manojlović, Evaluation of trace metals in thyroid tissues: Comparative analysis with benign and malignant thyroid diseases, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109479> (IF₂₀₁₈ = 4,527).

M22 – istaknuti međunarodni časopisi

A. Stojšavljević, B. Rovčanin, Đ. Krstić, S. Borković-Mitić, I. Paunović, V. Živaljević, B. Mitić, M. Gavrović-Jankulović, D. Manojlović, Cadmium as main endocrine disruptor in papillary thyroid carcinoma and the significance of Cd/Se ratio for thyroid tissue pathophysiology, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*,

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.06.009> (IF₂₀₁₇ = 3,755).

M64 – Саопштења на скуповима од националног значаја штампана у изводу

A. Stojšavljević, J. Mutić, *Disregulation of essential and toxic trace elements in hypothyroidism*, Peta konferencija Mladih hemičara Srbije, Beograd, Srbija, 2017.

A. Stojšavljević, I. Asanović, S. Borković-Mitić, B. Rovčanin, V. Živaljević, I. Paunović, B. Mitić, M. Gavrović-Jankulović, D. Manojlović, *Cadmium as the main endocrine disrupter in papillary thyroid carcinoma*, Osma konferencija Biohemijskog društva Srbije, Univerzitet u Novom Sadu, 2018.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Александар Б. Стојсављевић _____

број индекса _____ dx19/2014 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Металомика бенигних и малигних обољења тироидне жлезде

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, ____12. јул 2019.____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____Александар Б. Стојсављевић_____

Број индекса _____дх19/2014_____

Студијски програм _____Хемија_____

Наслов рада **Металомика бенигних и малигних обољења тироидне жлезде**_____

Ментор _____др Драган Манојловић, др Марија Гавровић-Јанкуловић_____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____12. јул 2019._____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Металомика бенигних и малигних обољења тироидне жлезде

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
--

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, ____12. јул 2019.____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.