

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE
Katedra za fiziologiju i biohemiju

Mr Svetlana Milanovi

UTICAJ PROPILTIOURACILA I JOPANOI NE
KISELINE NA FUNKCIJU TIREOIDNE
OSOVINE I AKTIVNOST GLUTATION
PEROKSIDAZA KOD SELEN-DEFICIJENTNIH I
SELEN-ADEKVATNIH JUVENILNIH PACOVA

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of physiology and biochemistry

Mr Svetlana Milanovi

THE INFLUENCE OF PROPYLTHIOURACIL
AND IOPANOIC ACID ON THYROID AXIS
AND GLUTATHIONE PEROXIDASES
ACTIVITIES IN SELENIUM ADEQUATE AND
SELENIUM DEFICIENT JUVENILE RATS

PhD thesis

Belgrade, 2012.

Mentor:

Dr Ivan Jovanovi , redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Komisija:

Dr Dušan Gledi , redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Olivera Val i , vanredni profesor,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Mirjana Joksimovi Todorovi , redovni profesor,
Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Bez podrške i pomoći velikog broja ljudi, ovaj ogroman posao nikada ne bi bio završen. Iza ove doktorske teze stoji rad i trud neverovatnih ljudi koji su mi svojim znanjem, voljom i nesebičnošću dali potrebnu energiju da ceo projekat dovedemo do kraja. Pre svega mislim na svog mentora, Prof. dr Ivana Jovanovića koji je imao veliko strpljenje u kritičnim situacijama i koji je svojom smirenošću i znanjem otklanjao za mene nepremostive prepreke. Zahvaljujem se svim članovima komisije na vrednim sugestijama.

Zahvaljujem se ljudima iz Agencije za lekove, posebno mr Srđanu Joksimoviću i Goranu Rosiću. Zahvaljujem se dr Sanji Vranješević, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke Vinča na stručnim savetima i praktičnoj pomoći pri izvođenju analiza i neverovatnoj pozitivnoj energiji. Zahvaljujem se i Srđanu Stefanoviću, istraživaču saradniku na Institutu za higijenu i tehnologiju mesa, na svim radnim subotama i nedeljama.

Zahvalnost dugujem kolegama i prijateljima sa Fakulteta veterinarske medicine, posebno Prof. dr Danijeli Kirovski i Doc. dr Darku Marinkoviću, koji su mi svesrdno pomagali na svakom koraku tokom izvođenja oglada i analiza.

Na kraju, veliko hvala mojim roditeljima i mojoj muškoj ekipi. Najviše vas volim!

Uticaj propiltiouracila i jopanoi ne kiseline na funkciju tireoidne osovine i aktivnost glutacion peroksidaza kod selen-deficijentnih i selen-adekvatnih juvenilnih pacova

Kratak sadržaj

U okviru ove doktorske disertacije, ispitivan je uticaj primene blokatora dejodinaza na tireoidni status selenadekvatnih i selendeficitnih juvenilnih pacova. Ogljed je izveden na ukupno 128 Wistar pacova muškog pola, podeljenih u osam grupa od po 16 jedinki. Formirane su sledeće grupe: 1. Se+PTU-IA- (kontrolna grupa), 2. Se+PTU+IA+, 3. Se+PTU+IA-, 4. Se+PTU-IA+, 5. Se-PTU-IA-, 6. Se-PTU+IA+, 7. Se-PTU+IA- i 8. Se-PTU-IA+. Prve četiri grupe su bile selenadekvatne (Se+) i dobijale su hranu koja je sadržala 0.334 mg selena po kilogramu hrane. Grupe pet, šest, sedam i osam su bile selendeficitne (Se-) i dobijale su 0.031 mg selena po kilogramu hrane. Kao blokatori dejodinaza su korišćeni propiltiouracil (PTU+) u dozi od 150 mg/L vode za piće i jopanoi na kiseline (IA+) u dozi od 6 mg/100g TM intraperitonealno. Nakon tri i sedam nedelja tretmana žrtvovano je po 8 jedinki iz svake grupe i određivani su sledeći parametri: tiroksin (T4), trijodtironin (T3), tireostimulirajući hormon (TSH), koncentracija selena u krvi, aktivnost citosolne glutacion peroksidaze eritrocita (GPx1) i aktivnost glutacion peroksidaze u krvnoj plazmi (GPx3).

Deficit selena doveo je do blagog pada telesne mase jedinki. Primena propiltiouracila (PTU) dovela je do značajnog pada telesne mase od 19% kod selenadekvatnih jedinki i 59% kod selendeficitnih jedinki. Pad koncentracije T4 i T3 i porast koncentracije TSH u krvnoj plazmi zabeležen je kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki tretiranih sa PTU, nakon tri nedelje tretmana. Nakon sedam nedelja, koncentracije T3 u krvi svih selenadekvatnih jedinki su bile ujednačene, a kod selendeficitnih jedinki je pri upotrebi PTU bila smanjena koncentracija T3 u krvi. Istovremena upotreba jopanoi ne kiseline i propiltiouracila kod selendeficitnih jedinki dovela je do rasta aktivnosti GPx1 nakon tri nedelje i GPx3 nakon sedam nedelja tretmana. Upotreba PTU je dovela do gubitka korelacione zavisnosti između koncentracije selena u krvi i aktivnosti GPx1 kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki nakon tri nedelje tretmana, a nakon sedam nedelja tretmana, upotreba PTU sa ili bez jopanoi ne kiseline je dovela do gubitka korelacione zavisnosti između koncentracije selena u krvi i aktivnosti GPx3. Negativna

korelaciona zavisnost izme u koncentracije T3 i aktivnosti GPx1 kod selendeficitnih jedinki uo ena je nakon tri nedelje tretmana, a nakon sedam nedelja izme u koncentracije T3 i aktivnosti GPx3.

Ključne reči: selen, propiltiouracil, jopanoi na kiselina, T4, T3, TSH, glutation peroksidaza

Nau na oblast: VETERINARSKA MEDICINA

Uža nau na oblast: BIOHEMIJA, ENDOKRINOLOGIJA

UDK: 619..577.1

The influence of propylthiouracil and iopanoic acid on thyroid axis and glutathione peroxidases activities in selenium adequate and selenium deficient juvenile rats

Summary

The effects of the applied deiodinase blockers on the thyroid status of selenium adequate and selenium deficient juvenile rats were studied. The experiment was carried out on 128 male Wistar rats randomly allotted to 8 groups, 16 rats each. The following groups were formed: 1. Se+PTU-IA- (control group), 2. Se+PTU+IA+, 3. Se+PTU+IA-, 4. Se+PTU-IA+, 5. Se-PTU-IA-, 6. Se-PTU+IA+, 7. Se-PTU+IA- i 8. Se-PTU-IA+. The first four groups were selenium adequate (Se+) and were fed a diet containing 0.334 mg/Se kg feed. Groups five, six, seven and eight were selenium deficient and fed 0.031 mgSe/ kg feed. As deiodinase blockers were used propylthiouracil (PTU+) in a dose of 150 mg/L potable water and iopanoic acid (IA+) in a dose of 6 mg/kg body mass applied intraperitoneally. After 3 and 7 weeks of treatment eight rats from each group were sacrificed and the following parameters were determined: thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), Thyroid stimulating hormone (TSH), blood selenium concentration, erythrocyte cytosolic glutathione peroxidase activity (GPx1) and blood plasma glutathione peroxidase activity (GPx3).

Selenium deficiency resulted in decreased body mass. Application of propylthiouracil resulted in decreased body mass by 19% in selenium adequate and by 59% in selenium deficient rats. A decrease in T4 and T3 concentration and increased TSH concentration in the blood plasma was recorded in both selenium adequate and selenium deficient groups treated with PTU after three weeks of treatment. After seven weeks T3 concentration in all selenium adequate rats was uniform, and selenium deficient PTU treated rats had decreased blood T3 concentrations. Concurrent use of IA and PTU in selenium deficient animals resulted in increased GPx1 activity after 3 weeks and GPx3 after 7 weeks of treatment. The use of PTU led to the loss of correlation between blood selenium and GPx1 treatment in both selenium adequate and deficient rats after three weeks of treatment. After seven weeks of treatment PTU (with or without the concurrent application of IA) resulted in the loss of correlation between blood selenium concentration and GPx3 activity. A negative correlation between T3 concentration and GPx1 activity in selenium

deficient rats was recorded after three weeks of treatment, and between T3 concentration and GPx3 activity after seven weeks.

Key words: selenium, propylthiouracil, iopanoic acid, T4, T3, TSH, glutathione peroxidase.

Science: veterinary medicine

Specific science: BIOCHEMISTRY, ENDOCRINOLOGY

UDK: 619..577.1

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Metabolizam selena	4
2.1.1. Resorpcija	4
2.1.2. Transport	5
2.2. Selenoproteini	6
2.2.1. Glutation peroksidaze	7
2.2.2. Tioredoksin reduktaze	11
2.2.3. Jodotironin dejodinaze	13
2.2.4. Ostali selenoproteini	13
2.3. Sinteza selenoproteina	16
2.3.1. Mehanizam biosinteze selenocisteina	16
2.3.2. Mehanizam ugradnje selenocisteina u polipeptidni lanac selenoproteina	18
2.3.3. Regulacija sinteze selenoproteina	20
2.3.4. Uticaj selena na sintezu selenoproteina	22
2.4. Tireoidna osovina, sinteza tireoidnih hormona i regulacija	24
2.4.1. Selen i funkcija tireoideje	25
2.4.2. Transport tireoidnih hormona	26
2.4.3. Dejodinaze	26
2.4.4. Uloga dejodinaza u regulaciji tireoidne osovine	31
2.4.5. Homeostaza T3	33
2.4.6. Intracelularna homeostaza T3	33
2.4.7. Uticaj selena na sintezu T3 i T4	36
3. CILJEVI I ZADACI	39
4. MATERIJAL I METODE	40
4.1.1. Izbor materijala	40
4.1.2. Eksperimentalni protokol	40

4.1.3. Ishrana pacova	41
4.2. Metode	42
4.2.1. Određivanje parametara tireoidne osovine	42
4.2.1.1. Određivanje koncentracije T3 i T4	42
4.2.1.2. Određivanje koncentracije TSH	43
4.2.2. Određivanje parametara statusa selena	43
4.2.2.1. Određivanje koncentracije selena u punoj krvi	44
4.2.2.2. Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze u punoj krvi (GPx1) i plazmi (GPx3)	44
4.3. Statistička obrada podataka	46
5. REZULTATI	47
6. DISKUSIJA	86
7. ZAKLJUČCI	103
8. SPISAK LITERATURE	105
9. SKRAĆENICE	126
BIOGRAFIJA	

1. Uvod

Nakon otkrića da jodotironin dejodinaze pripadaju superfamiliji selenoenzima (Behne i sar., 1990; Arthur i sar., 1990; Berry i sar., 1991) razvila se snažna istraživačka aktivnost sa ciljem da se objasni povezanost funkcija tireoidne osovine i statusa joda sa jedne i statusa selena sa druge strane. Načinjenicu da su ove dve pojave međusobno povezane, ukazala su i istraživanja endemskog kretinizma u Zairu (Vanderpas i sar., 1990). Pokazalo se da na područjima ekstremno deficitnim jodom i selenom, uobičajeno lečenje hipotireoidnih pacijenata nadoknadom joda dovodi do degenerativnih promena na štitastoj žlezdi i da tek zajedničko dodavanje ova dva elementa vodi ka ozdravljenju. Istraživanja o složenoj međuzavisnosti funkcije tireoidne osovine i statusa selena odvijaju se na više planova. Metodama molekularne biologije rasvetljena je ultrastruktura većeg broja selenoenzima i jedinstveni načini njihove sinteze. Istraživanja u oblasti biohemije i fiziologije usmerena su na definisanje međuzavisnosti, hijerarhije i mehanizama regulacije funkcija bioloških sistema u koje su uključeni selenoenzimi.

Selen je esencijalni mikroelement sa mnogostrukim i vrlo važnim ulogama u organizmu. Za razliku od ostalih mikroelemenata koji figuriraju kao kofaktori pojedinih enzima, njegove fiziološke uloge direktno su povezane sa funkcijama proteina u kojima sastav se kotranslatorno ugrađuje putem netipične aminokiseline selenocisteina. Do sada je otkriveno oko 30 selenoproteina, a samo za neke od njih je poznata fiziološka uloga. Prvi enzim za koji je dokazano da u svom sastavu ima ugrađen selenocistein je glutation peroksidaza GPx (Rotruck i sar., 1973; Flohe i sar., 1973). Do sada je identifikovano 5 izoenzimskih formi GPx koje redukuju vodonik peroksid i organske hidroperokside, štite ćelije od oksidativnog oštećenja. Ova grupa selenoenzima obuhvata citosolnu glutation peroksidazu (GPx1), gastrointestinalnu glutation peroksidazu (GPx2), plazmatsku (ekstracelularnu) glutation peroksidazu (GPx3), fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidazu (GPx4) i novootkrivenu glutation peroksidazu 6 iz olfaktornog epitela i embrionalnog tkiva. S obzirom na to da je glutation peroksidaza selenoenzim i da njena aktivnost do izvesne granice linearno zavisi od količine selena u hrani, aktivnost ovog enzima može biti dobar pokazatelj statusa selena u organizmu.

Sasvim novo polje u istraživanjima je donelo otkriće da su i jodotironin dejodinaze (ID) selenoenzimi, odgovorni za aktivaciju i deaktivaciju tireoidnih hormona

(Behne i sar., 1990; Arthur i sar., 1990; Berry i sar., 1991). Do sada je identifikovano 3 tipa dejodinaza. Tip 1 (ID1) vrši dejodinaciju spoljnog prstena tiroksina (T4) u položaju 5' i time aktivira prohormon T4 u aktivni T3. Tako e inaktivira T4 u reverzni T3 (rT3) dejodinacijom unutrašnjeg prstena u položaju 5. Zastupljena je u jetri, bubrezima, centralnom nervnom sistemu, hipofizi, crevima i placenti. Dejodinaza tipa 1 je vrlo osetljiva na inhibiciju sa propiltiouracilom, za razliku od dejodinaza tipa 2 i 3. Dejodinaza tipa 2 (ID2) aktivira T4 u T3 dejodinacijom spoljnog prstena u položaju 5', a tako e prevodi reverzni T3 u 3,3' T2. Nalazi se u hipofizi, mozgu i mrkom masnom tkivu, a osetljiva je na dejstvo jopanoi ne kiseline (Germain DL, 1988a). Dejodinaza tipa 3 (ID3) katalizuje dejodinaciju unutrašnjeg prstena tireoidnih hormona pri emu nastaju neaktivni rT3 od T4, odnosno 3,3'-T2 od T3. Prisustvo selenocisteina u kataliti kom centru ovih enzima ima presudnu ulogu u njihovoj kataliti koj aktivnosti. Veoma je zna ajno da je pri deficitu selena održavanje aktivnosti ovih enzima prioritet u odnosu na druge selenoenzime, te je ekspresija ID1 u štitastoj žlezdi nepromenjena ili ak blago pove ana (Bates i sar., 2000), ali je smanjena u jetri i bubrezima. Promena koncentracije serumskog T3 je mala i pored pove anja serumskog T4 i opšteg povišenja serumskog rT3 (DePalo i sar., 1994). Ovi rezultati su ukazali da ID1 jetre i bubrega minimalno doprinosi koncentraciji serumskog T3 te da je glavni izvor cirkulišu eg T3 štitasta žlezda (Chanoine i sar., 1993). Da bi se otklonio ovaj problem, efekat deficita selena je izu avan na tireoidektomisanim pacovima kojima je davan T4. Ova prou avanja su analogna onima izvedenim uz upotrebu propiltiouracila (PTU) u kojima je prona ena inhibicija ekstratireoidne konverzije T4 u T3 za oko 50% (Frumess i Larsen, 1975). Sva ova istraživanja nisu uzela u obzir uticaj ID2 koja tako e aktivira T4 u T3. Ekspresija ID2 i ID3 u uslovima deficita selena u mozgu i placenti je tako e o uvana jer su ova tkiva otporna na pražnjenje selena. Ovakvi rezultati navode na postojanje lokalnih mehanizama za uvanje selena u tkivu mozga i štitaste kao i na to da su prilikom ekstratireoidnog aktiviranja T4 u T3 podjednako aktivne i ID1 i ID2.

Do danas nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi regulacije sinteze, aktivacije i inaktivacije tireoidnih hormona i njihova zavisnost od prisustva selena. S obzirom na to da su dejodinaze selenoenzimi i da je održavanje nivoa njihove ekspresije prioritet u odnosu na druge selenoenzime, ispitivanje uticaja specifi nih blokatora za dejodinazu tipa 1 i dejodinazu tipa 2 u kombinaciji sa deficitom selena *in vivo* na proizvodnju T4,

T3 i TSH mogao bi ukazati na mehanizam regulisanja proizvodnje ovih hormona odnosno aktivnosti dejodinaze 1 i 2 kao i povratni uticaj na aktivnost ostalih selenoenzima.

2. Pregled literature

2.1. Metabolizam selena

Gotovo 200 godina nakon otkrića selena može se reći da ovaj esencijalni mikroelement ima neprocenljivu važnost za živi svet jer ulazi u sastav mnogih antioksidativnih enzima kao što su glutathion peroksidaza i tioredoksin reduktaza, prevenira pojavu kancera (Combs i Lu, 2001), kardiovaskularnih bolesti (Rayman, 2002; Mihajlović i sar., 2003; Beckett i sar., 2004), a tako je neophodan za optimalno funkcionisanje endokrinog i imunskog sistema (McKenzie i sar., 2002; Arthur i sar., 2003).

2.1.1. Selen u hrani i njegova resorpcija

Glavni izvor selena za životinje predstavljaju biljna hraniva u kojima se ovaj mikroelement najčešće nalazi u obliku selenometionina i selenocisteina. Nivo selena u biljkama zavisi od količine selena u zemljištu u kojem je zastupljen u vidu neorganskih soli i to selenita, selenata i selenida (Whanger, 2002). S obzirom na to da su pojedina područja izrazito deficitna selenom i da hrana poreklom iz tih područja sadrži nedovoljne količine selena, on se u hranu može dodavati u vidu suplemenata kao što su natrijum selenit, selenizirani kvasac i selenometionin.

Selen se ne resorbuje u želucu viših kičmenjaka (Whanger i sar., 1976). Selenit i selenometionin se resorbuju u tankom crevu pri čemu je resorpcija nešto intenzivnija u duodenumu. Pri resorpciji selenita, redukovani glutathion (GSH) iz lumena creva neenzimski reaguje sa selenom formirajući i selenodiglutation. Nastalo jedinjenje u enterocite unosi -glutamil transferaza (Anundi i sar., 1984).

Selenat se resorbuje u ileumu aktivnim kotransportom zajedno sa jonima natrijuma (Wolfram, 1999). Povećanje količine selenita ne utiče na resorpciju selenata što ukazuje na postojanje posebnih transportnih mehanizama za ova dva oblika selena (Wolfram i sar., 1985).

McConnell i Cho (1965) su koristeći izvrnute crevne kese hrčaka utvrdili da se selenometionin resorbuje suprotno svom gradijentu i da se ovaj proces inhibira povećanjem koncentracije L-metionina. Na osnovu svojih nalaza su zaključili da je

transportni mehanizam za ove dve aminokiseline isti, odnosno da se one resorbuju mehanizmom aktivnog transporta preko istih nosa a.

Whanger i saradnici (1996) su koriste i model perfuzije kroz tanka creva pacova prou avali transfer selenita, selenata i selenometionina do vaskularne strane enterocita. Selenometionin je 2,4, a selenat 1,5 puta brže transportovan u odnosu na selenit. Osim toga, postojale su zna ajne razlike u metabolitima prona enim na vaskularnoj strani enterocita. Kada je davan selen u obliku selenita, na vaskularnoj strani enterocita se našlo svega 14% selenita. Prona eni su još i selenodicistein (10%), selenotrisulfid (14%), selenodiglutation (8%) i neidentifikovane komponente (14%) od ukupno resorbovanog selenita. Selenat je gotovo nepromenjen transportovan do bazalne membrane (89%), a sli no njemu i selenometionin. Ovo je ukazalo na vrlo izražen metabolizam selenita u samim enterocitima, a samim tim je postalo diskutabilno koliko je efikasno njegovo dodavanje u hranu (Surai, 2006).

2.1.2. Transport selena

Postoje bitne razlike u metabolizmu neorganskog (natrijum selenit, selenat i selenid) i organskog (selenometionin i selenocistein) selena.

Još davne 1976. godine su Gasiewicz i Smith uo ili da proteini krvne plazme ne vezuju selenit ukoliko se u medijum ne dodaju eritrociti. Ovaj efekat su potvrdili i mnogi drugi autori (Jenkins i Hidiroglou, 1972; Sandholm, 1975). Nakon resorpcije, selenit preuzimaju eritrociti preko band-3 proteina (Yang i sar., 1996), a zatim redukuju u selenid pomo u glutaciona. Po izlasku iz eritrocita, selenid se vezuje za albumine (Shiobara i sar., 1998) i transportuje do jetre. Shigeta i saradnici (2008) su ispituju i distribuciju i raspodelu radioaktivnog selenita ($^{82}\text{SeO}_3^{2-}$) otkrili vrh Se-albumina i citosolne glutacion peroksidaze ve nakon 1 sata od aplikacije dok je najve a koncentracija selenoproteina P uo ena 6 sati nakon aplikacije. Pomenuti selenoprotein P je protein krvne plazme koji je zadužen za transport selena od jetre do ostalih tkiva, a u zavisnosti od životinjske vrste sadrži 8-17 rezidua selenocisteina (Burk i Hill, 2005). Ostaje nejasno koje su njegove rezidue selenocisteina funkcionalne, a koje predaje tkivima.

Za razliku od selenita, selenat ne ulazi u eritrocite već preko transportnog sistema za fosfat ulazi u hepatocite gde se redukuje u selenit, a zatim u selenid i ugrađuje u selenoprotein P (Kobayashi i sar., 2001). Veći deo neorganskog selena biva eliminisan fecesom kod preživara, a urinom kod nepreživara (Wolfram, 1999).

Organski selen, najčešće zastupljen kao selenometionin (SeMet), metaboliše se kao i metionin (Wolfram, 1999). Nakon resorpcije on ulazi u aminokiselinski put jer se nespecifično, umesto metionina, može ugrađivati u različite proteine.

2.2. Selenoproteini

Za razliku od drugih proteina u čiji sastav metali ulaze kao kofaktori, selen se u proteine ugrađuje kao selenocistein. Grupa proteina koja u svom sastavu ima selenocistein kao integralni funkcionalni deo polipeptida nazivaju se selenoproteini. Pored selenoproteina postoje i proteini koji sadrže nespecifično ugrađeni selen, kao i selen-vezujući proteini gde je on kofaktor. Nespecifično vezivanje selena u polipeptid je posledica nemogućnosti razlikovanja tRNK za metionin i selenometionin te se praktično selenometionin ugrađuje u polipeptid umesto metionina. Nije jasna fiziološka uloga ovakve ugradnje selenometionina u proteine (Papp i sar., 2007).

Do sada su identifikovana dva selen-vezujuća proteina: SLP-14 i SLP-56. Njihove funkcije se povezuju sa regulacijom ćelijskog rasta (Giometti i sar., 2000), detoksikacionim procesima (Pumford i sar., 1992), transportom proteina unutar Goldži kompleksa (Porat i sar., 2000), starenjem (Cho i sar., 2003) i metabolizmom lipida (Park i sar., 2004).

Kod ljudi i glodara je identifikovano preko 20 vrsta selenoproteina. Neki od njih imaju slične funkcije u organizmu, ali su kodirani sa nekoliko različitih gena kao što su glutation peroksidaze (5), tioredoksin reduktaze (3), jodotironin dejodinaze (3), selenofosfat sintetaze (2), Sep15, SelH, SelI, SelK, SelM, SelN, SelO, SelP, SelR, SelS, SelT, SelV i SelW. Samo nekolicini od ovih proteina je poznata fiziološka uloga i to tioredoksin reduktazama, glutation peroksidazama, dejodinazama i SPS2 i sve su vezane za procese oksidoredukcije. Svi do sad identifikovani selenoproteini prikazani su u tabeli 2.1.

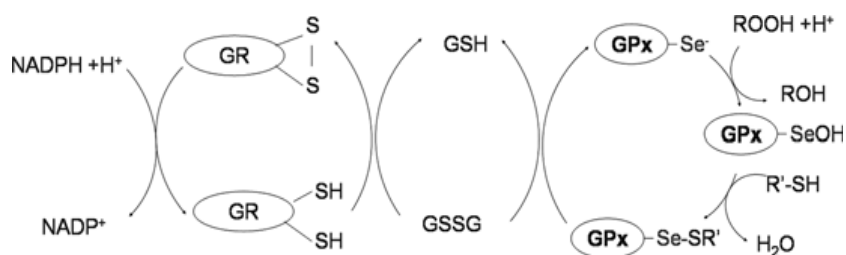
Tabela 2.1. Selenoproteini, njihova distribucija u organizmu i funkcije (Pappas i sar., 2008)

Enzim/protein	Skraćenica	Funkcija u organizmu	Tkivo, elija
Glutation peroksidaze			
Citosolna	cGPx, GPx-1	Antioksidativna zaštita	Gotovo sva tkiva i elije
Plazmatska	pGPx, GPx-3	Antioksidativna zaštita	Ekstracelularni prostor, plazma
Gastrointestinalna	GI-GPx, GPx-2	Antioksidativna zaštita	GIT
Fosfolipid hidroperoksid glutacion peroksidaza	GPx-4	Antioksidativna zaštita	el. membrana, razna tkiva
Glutation peroksidaza	GPx-6	Antioksidativna zaštita	Olfaktorna sluzokoža, embrionska tkiva
Tioredoxin reduktaze			
Tioredoxin reduktaza 1	TRxR1	Deo tioredoxin sistema, antioksidativna zaštita, redoks regulacija, elijska signalizacija	Citoplazma, jetra, srce, bubrezi
Tioredoxin reduktaza 2	TRxR2	Deo tioredoxin sistema, antioksidativna zaštita, redoks regulacija, elijska signalizacija	Mitohondrije, jetra, bubrezi
Tioredoxin reduktaza 3	TRxR3	Deo tioredoxin sistema, antioksidativna zaštita, redoks regulacija, elijska signalizacija	Testisi
Jodotironin dejodinaze			
Dejodinaza 1	ID1	Konverzija T4 u T3 i T4 u rT3	Jetra, bubrezi, štitasta žlezda
Dejodinaza 2	ID2	Konverzija T4 u T3	Jetra, bubrezi, štitasta žlezda, mrko masno tkivo
Dejodinaza 3	ID3	Konverzija T4 u rT3	Placenta, mozak, koža
Selenofosfat sintetaza	SPS2	Sinteza selenofosfata	Testisi, razna tkiva
15-kDa selenoprotein	Sel 15	elijska apoptoza	ER, T limfociti, razna tkiva
Selenoprotein H	Sel H	Nepoznata, verovatno u regulaciji gena odgovornih za sintezu glutaciona	
Selenoprotein I	Sel I	Etanolaminfosfotransferazna aktivnost	
Selenoprotein K	Sel K	Antioksidativna zaštita	Kardiomiociti
Selenoprotein M	Sel M	Vezana za Sel 15, mogu a uloga u etiologiji kancera	Mozak, razna tkiva
Selenoprotein N	Sel N	?????	ER
Selenoprotein O	Sel O	Nepoznata	Široko rasprostranjen
Selenoprotein P	Sel P	Transport selena, antioksidativna zaštita	Plazma, mnoga tkiva
Selenoprotein R	Sel R	Redukcija oksidovanog metionina u ošte enim proteinima	Citosol, jedro
Selenoprotein S	Sel S	elijska redoks ravnoteža, mogu a uloga u imunskom odgovoru	ER
Selenoprotein T	Sel T	Homeostaza Ca ²⁺ , neuroendokrini sekrecija	Ubikvitaran
Selenoprotein V	Sel V	Nepoznata, mogu a u redoks regulaciji	Testisi
Selenoprotein W	Sel W	Antioksidativna zaštita	Srce i druga tkiva

2.2.1. Glutation peroksidaze

Glutation peroksidaza je prvi protein sisara za koji je pokazano da u kataliti kom centru ima ugra en selen u obliku selenocisteina (Forstrom i sar., 1978). Ovaj enzim katalizuje redukciju vodonik peroksida i organskih hidroperoksida štite i eliju od oksidativnih ošte enja. Kod ljudi je identifikovano sedam glutacion peroksidaza od ega su pet selenoenzimi, a dve umesto selenocisteina imaju cistein. Familiji glutacion

peroksidaza pripadaju: citosolna glutation peroksidaza (cGPx ili GPx1) za koju je Flohe sa saradnicima (1973) utvrdio da ne sadrži hem niti bilo koji drugi metal osim selena; gastrointestinalna GPx (GI-GPx ili GPx2) koju su opisali Wingler i Brigelius-Flohe (1999); glutation peroksidaza krvne plazme (pGPx ili GPx3) iju su primarnu strukturu opisali Takahashi i saradnici 1990. godine; fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza (PHGPx ili GPx4) (Thomas i Girotti, 1988) i glutation peroksidaza 6 (GPx6) koja je pronađena u olfaktornom epitelu i u tkivima embriona (Kryukov i sar., 2003). Relativne molekulske mase su im prilično ujednaene. U sastav enzima ulaze četiri identične subjedinice, a svaka od njih u katalitičkom centru sadrži atom selena ugrađen u selenocistein. Subjedinica GPx se sastoji od 198 aminokiselina, a selenocistein je po redosledu 45. aminokiselina (Günzler i sar., 1984). Mehanizam redukcije uz pomoć GPx je prikazan na slici 2.1.



Slika 2.1. Mehanizam redukcije uz pomoć GPx.

Glutation peroksidaza 1 (GPx1) je enzim citoplazme koji redukuje vodonik peroksid i perokside slobodnih masnih kiselina. Gen GPx1 je prvi gen sisara za koji je pokazano da položaj UGA odgovara mestu selenocisteina u katalitičkom centru proteina (Chambers i sar., 1986). Nedugo zatim je utvrđeno da tRNK koja ugrađuje Sec ima anti-kodon komplementaran sa UGA (Leinfelder i sar., 1988). Genetski modifikovani miševi koji nemaju ovaj enzim su zdravi i plodni i u odnosu na divlje sorte ne pokazuju povećanu senzitivnost na hiperoksiju, što znači da je uloga ovog enzima u fiziološkim uslovima i normalnom razviću ograničena (Ho i sar., 1997). Ipak, kada su ovi miševi bili izloženi agensima koji izazivaju oksidativni stres kao što su vodonik peroksid i parakvat, bili su povećani i morbiditet i mortalitet (de Haan i sar., 1998). Cheng i saradnici (1998, 1999, 2003) smatraju da GPx1 ima veliku ulogu pri oksidativnom stresu izazvanom vodonik peroksidom i da ovaj efekat postiže sprečavanjem oksidacije NADPH, NADH, lipida i proteina. Dokazano je da je ova peroksidaza vrlo važna u

zaštiti od virusne infekcije što je uo eno kod *knockout* miševa kod kojih se razvila kardiomiopatija sli na Kešanskoj bolesti kod ljudi zaraženih *Coxsackie* virusom (Beck i sar., 1998). Ova peroksidaza je vrlo osetljiva na promene statusa selena pri emu kod selendeficitnih jedinki pada nivo iRNK i samog proteina. Regulacija transkripcije GPx1 nije u potpunosti rasvetljena. Promoter gena sadrži element za odgovor na kiseonik (*oxygen responsive element-ORE*) i neki tipovi elija pove avaju transkripciju iRNK za GPx1 kao odgovor na hiperoksiju. Izolovan je i ORE vezuju i protein (*ORE binding protein-OREBP*) koji je i sam regulisan parcijalnim pritiskom kiseonika. Iako je pozitivna regulacija GPx1 uo ena i sa estrogenima, na samom genu nije dokazano prisustvo elementa za odgovor na estrogen. Pretpostavlja se da je dejstvo estradiola posredno, preko aktivacije *jedarnog faktora kapa B* (NF B). Neka izu avanja su potvrdila da se u uslovima stresa kao što su hipoksija, ošte enje DNK izazvano radijacijom ili adriamicinom, za promotor GPx1 gena vezuje protein 53 (p53) (Habeos i sar., 2008).

Glutation peroksidaza 2 (GPx2) je prona ena u epitelu gastrointestinalnog trakta, a struktura joj je sli na sa GPx1 (Wingler i Brigelius-Flohe, 1999). Iako se nalazi u svim elijama epitela creva, najviše je zastupljena u kriptama te su Florian i sar. (2001) ukazali na mogu u ulogu ovog enzima kod elija koje su u proliferaciji. Miševi kod kojih je genskom modifikacijom spre ena sinteza GPx2 su normalno razvijeni, ali kombinacija nedostatka i GPx1 i GPx2 dovodi do zaostajanja u razvoju kao i bakterijskih infekcija creva što dovodi do razvoja tumora ileuma (Esworthy i sar., 2001; Chu i sar., 2004). Smatra se da je antikancerogena uloga GPx2 vezana za metabolisanje vodonik peroksida nastalog usled inflamacije (Esworthy i sar., 2005). Koliko je GPx2 važan može se zaklju iti i iz injenice da pri deficitu selena koli ina njene iRNK ne opada, a da se pri repleciji selenom ovaj enzim mnogo brže sintetiše u odnosu na ostale selenoproteine. Na promoteru GPx2 gena se nalazi element za odgovor na antioksidante i elektrofile (*antioxidant/electrophile responce element-ARE/EpRE*), a tako e se može vezati i Nrf2/Keap1 sistem (*nuclear factor E2-related factor2/ Klech-like ECH associating protein 1*) koji kontroliše ekspresiju nekoliko gena kao odgovor na oksidativni stres.

Glutation peroksidaza 3 (GPx3) je jedini enzim iz familije glutacion peroksidaza koji se lu i u me u elijski prostor. Supstrat za ovaj enzim su vodonik peroksid,

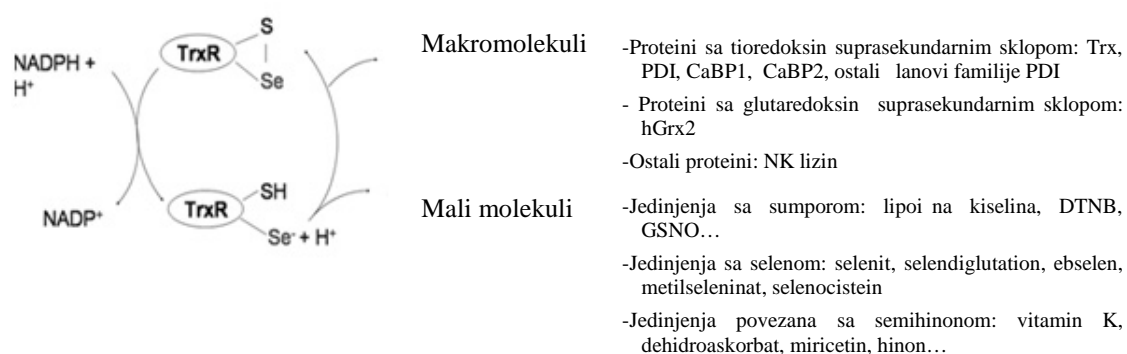
hidroperoksidi masnih kiselina, fosfolipidni hidroperoksidi, a ima značajnu ulogu u antioksidativnim procesima u krvnoj plazmi (Brigelius-Flohe, 1999). Kako aktivnost ovog enzima opada i do 99% u slučaju deficita selena, GPx3 se široko koristi u proceni statusa selena. Takođe, pošto se povećana aktivnost javlja kod nekih subtipova tumora jajnika (Hough i sar., 2001), može se koristiti kao biomarker. Glavni izvor ekstracelularne GPx su bubrezi, a sintetisuje je epitelne ćelije proksimalnih tubula nefrona i parietalne ćelije Bowmanove kapsule (Yoshimura i sar., 1991). Informaciona RNK ovog enzima je nalazna i u srcu (Hoffmann i sar., 2007), štitastoj žlezdi (Schmutzler i sar., 2007), a smatra se da GPx3 služi kao lokalni ekstracelularni antioksidans. Iako reakcije koje katalizuje ovaj enzim u *in vivo* uslovima nisu sasvim rasvetljene, studije u *in vitro* uslovima ukazuju da pri dodavanju glutaciona, tioredoksina ili glutaredoksina dolazi do redukcije vodonik peroksida (Björnstedt i sar., 1994). Freedman i sar. (1996) su ukazali na važnu ulogu GPx3 u regulisanju bioraspodivnosti azot oksida (NO) kojeg proizvode trombociti i endotelne ćelije. Azot oksid aktivira guanilil ciklazu, inhibira fosfoinozitol 3 kinazu i inhibira ciklooksigenazu 1 te ima važnu ulogu u ograničavanju aktivacije, adhezije i agregacije trombocita. U uslovima smanjene aktivnosti glutacion peroksidaze, lipidni hidroperoksidi se ne redukuju u odgovarajuće alkohole već reaguju sa azot oksidom (NO) i smanjuju njegovu koncentraciju. Smanjena koncentracija NO dovodi do hiperreaktivnosti trombocita i povećava mogućnost nastanka trombocitoze. U *in vitro* uslovima hipoksija predstavlja snažan regulator transkripcije GPx3. Nedavna istraživanja su pokazala da ekspresija GPx3 gena u hipotalamusu miševa zavisi od stimulacije receptora za estrogen u masnom tkivu (Lundholm i sar., 2008).

Glutacion peroksidaza 4 (GPx4) za razliku od ostalih GPx, može direktno da redukuje fosfolipidne i holesterol hidroperoksidge koristeći elektrone iz tiolnih grupa samog proteina kao i od glutaciona (Imai i Nakagawa, 2003). Ova peroksidaza je zastupljena u citosolu, mitohondrijama, čak i u jedru ćelija različitih tkiva. Nedostatak enzima dovodi do smrti embriona (Imai i sar., 2003), a smanjena aktivnost uzrokuje povećanu osetljivost na oksidativni stres izazvan zračenjem, parakvatom, tercijalnim butilhidroperoksidom i vodonik peroksidom (Yant i sar., 2003). Ovaj enzim takođe učestvuje u sazrevanju spermatozoida. U spermatozoidima se nalazi kao solubilni enzim koji prolazi oksidativnu polimerizaciju formirajući i strukturnu osnovu mitohondrijalne kapsule zrelih spermatozoida (Ursini i sar., 1999). Jedarna izoforma GPx4 deluje kao

protein tiol peroksidaza te ima ulogu u kondenzaciji hromatina i njegovoj strukturnoj stabilnosti u spermatozoidima (Conrad i sar., 2005). Izu avanja vršena na pacovima su ukazala na povezanost nivoa selena i plodnosti mužijaka (Olson i sar, 2004). Petrujki (2010), na osnovu rezultata istraživanja izvedenih na nerastovima, tako e zaklju uje da selen ima pozitivan efekat na koncentraciju i pokretljivost spermatozoida. Smanjena aktivnost ovog enzima snizila je motilitet i vijabilnost spermatozoida ljudi (Foresta i sar, 2002).

2.2.2. Tioredoksin reduktaze

Enzimi tioredoksin reduktaze (TrxR) zajedno sa tioredoksinom i NADPH ine tioredoksin sistem koji je najve i elijski redoks sistem zastupljen kod svih organizama. Tioredoksin reduktaze kod sisara imaju razne uloge, a izme u ostalog, kontrolišu funkciju centralnog redoks molekula tioredoksina, a mogu i sami direktno da redukuju nekoliko substrata. Sadrže FAD domen, domen za vezivanje NADPH, me ufazni domen, a preposlednji domen je neophodan za enzimsku aktivnost i sadži reziduu selenocisteina (Zhong i Holmgren, 2000). Aktivni centar na N-terminalnom kraju je identičan aktivnom centru glutation reduktaze. On poseduje Cis-x-x-x-x-Cis motiv koji vrši transfer elektrona na aktivno mesto C-terminalnog kraja (Zhong i sar., 2000). Redukcija substrata se odigrava transferom elektrona sa NADPH na FAD pri emu se koriste aktivno mesto N-terminalnog kraja i aktivno mesto na C-terminalnom kraju naspramne subjedinice u kojoj se nalazi selenocistein (Biterova i sar., 2005).



Slika 2.2. Redukcija razli itih molekula pomo u tioredoksin reduktaze.

Do sada je identifikovano 3 tioredoksin reduktaze i to citosolna TrxR1 (Tamura i Stadtman, 1996), mitohondrijalna TrxR2 (Miranda-Vizuete i sar., 1999; Lee i sar., 1999) i TrxR3 iz testisa (Sun i sar., 2001). Ovo je za sada jedina poznata grupa enzima koja katalizuje NADPH zavisnu redukciju oksidovanog tioredoksina, te su mnogi elijski procesi vezani za aktivnost ovog enzima (Slika 2.2.). Tioredoksin sistem katalizuje redukciju disulfida u proteinima kao što su ribonukleotid reduktaza koja je neophodna za sintezu dezoksiribonukleotida (Holmgren, 1989); tioredoksin peroksidaza koja je važna u odbrani elija od oksidativnog stresa (Rhee i sar., 2005); protein disulfid izomeraza-PDI koja katalizuje formiranje disulfida proteina u endoplazmatskom retikulumu (Lundström i Holmgren, 1990); NK-lizin koji je antibakterijski polipeptid T limfocita (Andersson i sar., 1996).

Tioredoksin sistem ima centralnu ulogu u regulaciji ekspresije gena putem redoks kontrole transkripcionih faktora NF- κ B, Ref-1, AP-1, p53, glukokortikoidnih receptora i enzima apoptoza regulatorne kinaze te indirektno utiče na proliferaciju elija, elijsku smrt i aktivaciju imunskog odgovora (Rundlof i Arner, 2004).

Pored makromolekula, TrxR može redukovati i male molekule kao što su DTNB (5,5' ditionitrobenzoeva kiselina) što se i koristi prilikom utvrđivanja aktivnosti ovog enzima, zatim vitamin K, aloksan (Holmgren i Lyckeberg, 1980), dehidroaskorbat (May i sar., 1998). Tioredoksin reduktaza može redukovati i S-nitrozoglutation koji nastaje od azot(II)oksida, važnog molekula za redoks signalizaciju, i glutationa pri čemu se oslobađa NO[•] koji može inaktivirati redukciju disulfida (Nikitovi i Holmgren, 1996). Substrati za ovaj enzim takođe mogu biti selenit (Kumar i sar., 1992), selenodiglutation (Björnstedt i sar., 1992), metilseleninat, selenocistein i ebselen (Zhao i sar., 2002). Selenodiglutation i selenit se metabolišu u vodonik selenid koji je donor selena prilikom sinteze selenocisteina te ovaj enzim ima važnu ulogu u kontroli sinteze selenoproteina (Ganther, 1999).

TrxR može i direktno da redukuje lipidne hidroperokside (Björnstedt i sar., 1995) i vodonik peroksid, a prisustvo selenocisteina i ebselena ima pozitivan uticaj na ovaj proces (Zhao i sar., 2002).

Veza između suplementacije selena i ekspresije TrxR je kompleksna i zavisi od izvora selena kao i od tipa elija odnosno tkiva (Arner, 2009). Deficit selena smanjuje aktivnost TrxR u jetri i bubrezima dok je u mozgu ona odužavana (Hill i sar., 1997).

2.2.3. Jodotironin dejodinaze

Dejodinaze u estvuju u aktivaciji ili deaktivaciji tireoidnih hormona. Enzimaska familija jodotironin dejodinaza obuhvata tri enzima. Jodotironin dejodinaza tip 1 (ID1) aktivira prohormon T4 u aktivni T3 dejodinacijom spoljnog prstena tiroksina. Ovaj proces može katalizovati i dejodinaza tipa 2 (ID2). Deaktivaciju tiroksina i trijodtironina katalizuje dejodinaza 3 (ID3), dejodinacijom unutrašnjeg prstena.

Detaljniji prikaz gra e i funkcije ovih enzima i uloge u homeostazi tireoidnih hormona dat je u podpoglavlju 2.4.2.

2.2.4. Ostali selenoproteini

Selenoprotein H ima relativnu molekulsku masu od 14 000. Kataliti ki centar sadrži Cis-x-x-Sec motiv pri emu je sa X ozna ena bilo koja aminokiselina. Nalazi se u mnogim tkivima. Tokom deficita selena drasti no opada nivo iRNK ovog proteina (Sunde i sar., 2008). Selenoprotein H je lokalizovan u jedru, a studije pokazuju da se on može vezati za DNK kao odgovor na redoks status, da reguliše ekspresiju gena enzima koji u estvuju u *de novo* sintezi glutaciona i da u estvuje u drugoj fazi detoksikacije kao odgovor na redoks status (Panee i sar., 2007).

Selenoprotein I je kod ljudi zastupljen u raznim tkivima. Za ovaj protein se do skora nije znala funkcija sve dok nije utvr eno da poseduje sekvencu homolognu sekvenci enzima koji u estvuju u sintezi fosfolipida (Horibata i Hirabayashi, 2007).

Selenoprotein K je mali protein sa relativnom molekulskom masom od 16 000. Smešten je u membrani endoplazmatskog retikuluma (Lu i sar., 2006). Kod miševa se u ve oj meri nalazi u slezini i testisima (Hoffmann i sar., 2007), a kod ljudi u srcu (Lu i sar., 2006). Prekomerna ekspresija u kardiomiocitima smanjuje nivo slobodnih radikala, ali se ne zna ta an mehanizam ovog procesa.

Selenoprotein M i Sep 15 su smešteni u endoplazmatskom retikulumu, a imaju oko 30% identi nu sekvencu (Labunskyy i sar., 2007). S obzirom na to da imaju sekvence

homologne sekvencama disulfid izomeraza, Ferguson i saradnici (2006) pretpostavljaju da ova dva proteina imaju funkcije tiol-disulfid oksidoreduktaza.

Selenoprotein N je transmembranski protein sa relativnom molekulskom masom od 70 000 (Petit i sar., 2003). Postoje dve izoforme i obe su zastupljene u skeletnim mišima, mozgu, plućima i placenti (Moghadaszadeh i sar., 2001). Mutacije gena za selenoprotein N dovode do nekoliko poremećaja u mišima zajednički označenih kao SEPNI miopatije.

Selenoprotein O je identifikovan pre nekoliko godina (Kryukov i sar., 2003), ali se još uvek pouzdano ne zna ni distribucija u tkivima, ni subcelularna lokalizacija kao ni fiziološka uloga.

Selenoprotein P za razliku od ostalih selenoproteina, sadrži u polipeptidnom lancu nekoliko rezidua selenocisteina. Iako DNK za selP sadrži 10 UGA kodona, sam peptidni lanac u cirkulaciji ima manje od 10 rezidua Sec (Burk i Hill, 2005). Visok sadržaj selena u selenoproteinu P ukazuje na njegovu ulogu u transportu selena. Za ovaj protein je vezano 40-50% selena krvne plazme, a Schomburg i saradnici (2003) i Schweizer i saradnici (2005) na miševima dokazuju esencijalnu ulogu selenoproteina P u transportu selena. Tkiva koja su najviše pogođena usled nedostatka ovog proteina su mozak i testisi što su Hill i sar. (2003) i Renko i sar. (2008) potvrdili na *knockout* miševima. Kada je SelP *knockout* miševima injektirano obeležen selen, zapažen je smanjen nivo selena u mozgu i testisima, a povećan u jetri, na osnovu čega je zaključeno da se selen vezuje za selenoprotein P u jetri, sekretuje i dalje distribuira tkivima. Novija istraživanja sa intravenskom aplikacijom obeleženog selena su pokazala da se 1-6 sati nakon ubrizgavanja selena povećavaju koncentracije albumina i GPx3, a da je 6-72 sata nakon aplikacije selen vezan za selenoprotein P (Shigeta i sar., 2008). Iako venska aplikacija ne ocrta u pravoj meri unos selena hranom, ovi rezultati idu u prilog teoriji da je transport selena između tkiva u najvećoj meri zavisan od ovog selenoproteina. Pored ovoga, prisustvo receptora ApoER2 za unos Sel P u ćelije mozga (Valentine i sar., 2008) i testisa (Olson i sar., 2007) potvrđuje ulogu ovog

proteina kao transportera. Megalin, lipoproteinski receptor lokalizovan u epitelu proksimalnih tubula bubrega, odgovoran je za reapsorpciju Sel P iz primarne mokra e (Olson i sar., 2008). Selenoprotein P nema samo ulogu transportera selena, a na to ukazuje prisustvo razli itih domena sa aktivnoš u glutacion peroksidaze, kao i za vezivanje heparina i kompleksiranje teških metala (Burk i Hill, 2005).

Selenoprotein R je jedini enzim iz familije sulfoksid reduktaza koji ima selenocistein u aktivnom mestu-ostali imaju cistein. Nalazi se u mnogim tkivima, a najviše je zastupljen u jetri i bubrezima (Fomenko i sar., 2008). Smatra se da kod ljudi ovaj protein štiti od neurodegenerativnih procesa (Hansel i sar., 2005) i oksidativnih ošte enja tokom starenja (Stadtman, 2006).

Selenoprotein S je transmembranski protein lokalizovan u endoplazmatskom retikulumu u raznim tkivima (Ye i sar., 2004). Smatra se da ima ulogu u uklanjanju proteina iz lumena ER radi njihove razgradnje (Gao i sar., 2004) kao i u zaštiti elije od oksidativnih ošte enja (Gao i sar., 2007). Ekspresija ovog proteina je modulirana metabolizmom glukoze (Gao i sar., 2004).

Selenoprotein T je eksprimiran i tokom embrionalnog razvi a i kod adultnih pacova u mnogim tkivima, verovatno u endoplazmatskom retikulumu (Grumolato i sar., 2008). Pripada subfamiliji selenoproteina koji imaju sekvencu sli nu tioredoksinu i Cis-x-x-Sec motiv.

Selenoprotein V je eksprimiran u testisima, a funkcija je još uvek nepoznata. S obzirom na postojanje sekvence sli ne sekvenci tioredoksina kao i prosustvo Cis-x-x-Sec motiva, pretpostavlja se da ima ulogu u redoks reakcijama (Dikiy i sar., 2007).

Selenoprotein W tako e pripada subfamiliji selenoproteina koji imaju sekvencu sli nu tioredoksinu i Cis-x-x-Sec motiv, zajedno sa Sel T, Sel H i Sel V. Ima malu relativnu molekulsku masu od 9 500, a zastupljen je u razli itim tkivima (Gu i sar., 2000). Reaguje sa glutationom te se smatra da ima antioksidativnu ulogu u elijama (Beilstein i

sar., 1996). Nivo iRNK ovog proteina u velikoj meri zavisi od nivoa selena kao i od nivoa selenoproteina P (Sunde i sar., 2008; Hoffmann i sar., 2007).

Selenofosfat sintetaza 2 (SPS2) u estvuje u biosintezi selenoproteina jer katalizuje prenos i ugradnju monoselenofosfata u sec-tRNK (detaljnije objašnjenje je dato u sledećem poglavlju). Na taj način ovaj selenoprotein vrši autoregulaciju sopstvene sinteze kao i regulaciju svih ostalih selenoproteina (Guimares i sar., 1996). Na ćelijskim linijama fibroblasta miševa je dokazano da je ovaj protein neophodan za sintezu selenoproteina (Xu i sar., 2007a). Kod miševa deficitnih u selenoproteinu P uočeno je povećan nivo SPS2 iRNK dok je nivo svih ostalih iRNK selenoproteina u mozgu i testisima bio smanjen te su Hoffmann i saradnici (2007) zaključili da bi ovo mogao biti kompenzatorni mehanizam koji se javlja usled deficita selena u tkivima.

2.3. Sinteza selenoproteina

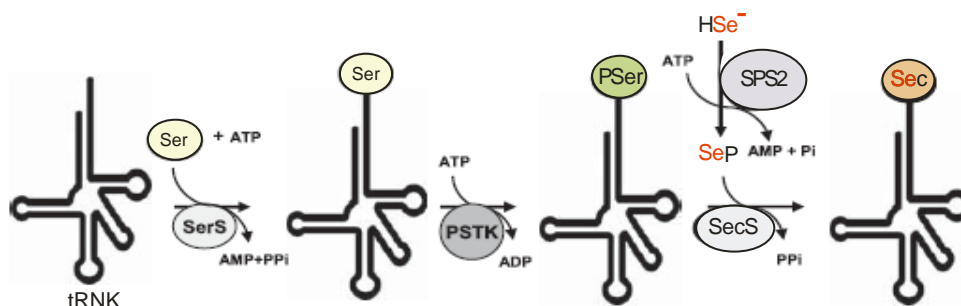
Sinteza selenoproteina je evolucijski konzerviran proces. Pronađene su velike razlike u mehanizmu sinteze selenoproteina između prokariota i eukariota, ali su za sve zajednički UGA-Sec kodon, specifična tRNK, SECIS element i nekoliko drugih faktora. Selenocistein je dvadesetprva genetski kodirana aminokiselina, pri čemu se UGA kodon, inače definisan kao STOP kodon i odgovoran za terminaciju translacije, očitava kao kodon za ugradnju selenocisteina.

2.3.1. Mehanizam biosinteze selenocisteina

Selenocistein (Sec) je aminokiselina koja se kotranslatorno ugrađuje u protein, a za razliku od ostalih aminokiselina, njegova sinteza se odvija na samoj tRNK (Lee i sar., 1989). Genom sisara sadrži samo jednu kopiju gena koji kodira dve Sec tRNK izoforme. Molekul sadrži 90 nukleotida sa 4 modifikovane baze (Itoh i sar., 2009). Ova dva tipa sekundarne strukture tRNK se označavaju kao 7/5 (7 parova baza na akceptorskom kraku i 5 parova baza na T kraku) i 9/4. Prilikom aminoacilacije, tj. vezivanja aminokiseline, za ovu tRNK se primarno vezuje serin uz katalitičku aktivnost seril-tRNK sintetaze (Slika 2.3.). Nastali seril-tRNK je prekursor za sintezu selenocisteil-tRNK. Seril-tRNK se aktivira pomoću fosfoseril tRNK kinaze (PSTK) u

fosfoseril-tRNK. Fosfoseril-tRNK je substrat za selenocistein sintazu (SecS). Ovaj enzim pripada superfamiliji piridoksal-fosfat zavisnih transferaza (Jeffrey i Berry, 2008) i defosforiliše O-fosfoseril-tRNK uz prenos monoselenofosfata na tRNK pri čemu se formira selenocisteil-tRNK (Sec-tRNK). Nedavno je otkriveno da i SLA protein (*soluble liver antigen*) ima ulogu u sintezi selenocisteina i da se vezuje zajedno sa SECp43 za Sec-tRNK formirajući kompleks. SECp43 je neophodan za metilaciju 2'-hidroksiribozila na *wobble* poziciji tRNK. Na osnovu subcelularne lokalizacije ovog molekula pretpostavlja se da ima ulogu u kretanju Sec-tRNK između jezdra i citoplazme (Xu i sar., 2005, 2007b).

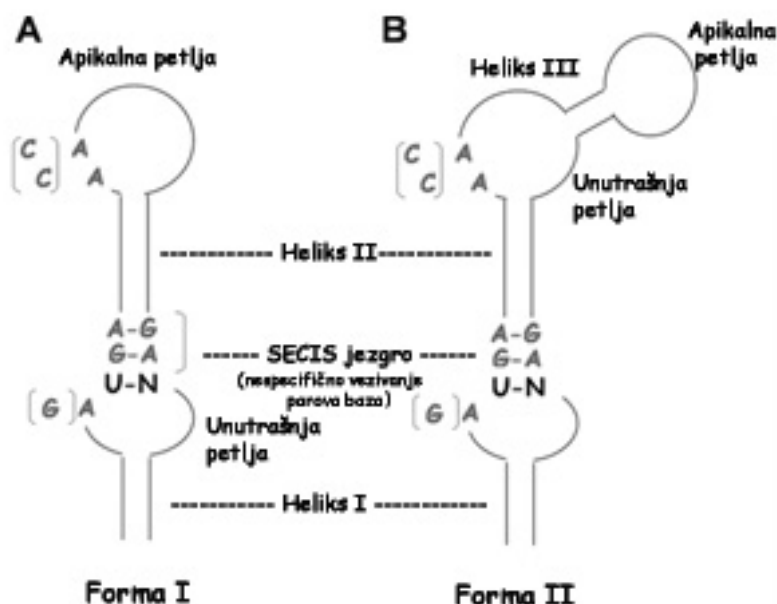
Monoselenofosfat je aktivna forma selena koji nastaje od selenida uz pomoć eš e ATP-a (Glass i sar., 1993). Enzim koji katalizuje ovu reakciju kod sisara je selenofosfat sintetaza 2 (SPS2) koja je i sama selenoprotein te se pretpostavlja da autoregulacijom sopstvene sinteze reguliše i sintezu ostalih selenoproteina (Guimaraes i sar., 1996).



Slika 2.3. Sinteza selenocisteina na samoj tRNK (objašnjenje dato u tekstu).

2.3.2. Mehanizam ugradnje selenocisteina u polipeptidni lanac selenoproteina

Da bi se UGA kodon 'pro itao' kao kodon za ugradnju selenocisteina, pored specifične tRNK neophodan je i takozvani *SECIS element*. On se nalazi na 3' netranslatornom regionu (UTR) iRNK za odgovarajućeg selenoprotein i po nekoliko hiljada nukleotida udaljen od UGA kodona, (Berry i sar., 1991). SECIS element ima oblik ukosnice i mogu ga sačinjavati različiti nukleotidi, ali postoje visoko-konzervirani delovi kao što su dve nesparene AA rezidue na apikalnoj petlji ukosnice (ili CC na SECIS elementu za selenoprotein M i selenoprotein O), AGUA(G) na 5' i GA na 3' kraju u bazi formacije. Između ovih nukleotida je uobičajeno nestandardno A-G i G-A sparivanje (Walczak i sar., 1998). Slično nestandardno sparivanje baza uobičajeno je na mestima RNK koja služe za vezivanje odgovarajućih RNK-vezujućih proteina. Ova forma SECIS elementa je zapažena kod glutation peroksidaza (GPx) i dejodinaze tipa 1 (ID1). Kod dejodinaza tipa 2 i 3 (ID2 i ID3), SECIS element ima dodatnu petlju (Slika 2.4.B).



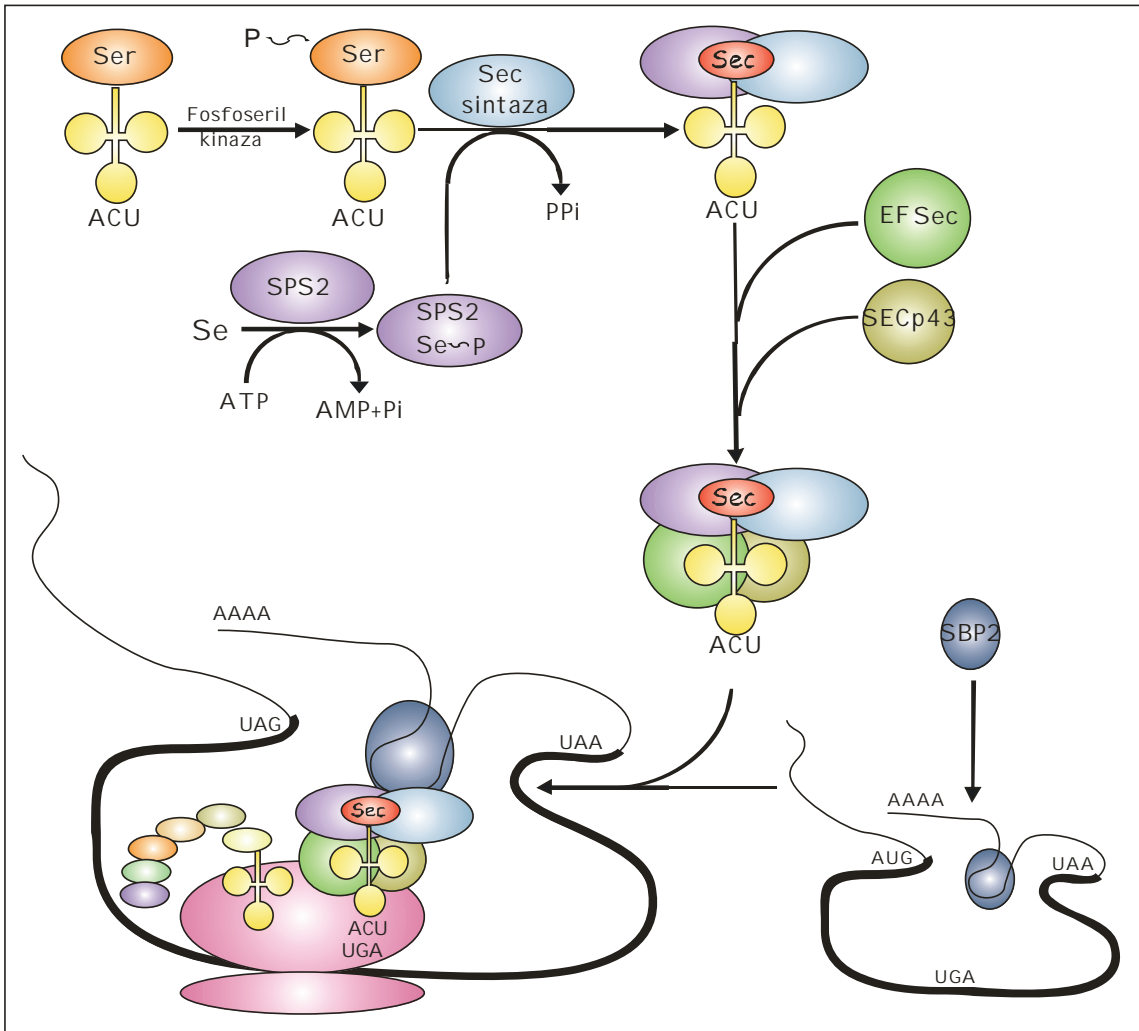
Slika 2.4. Tipovi građe SECIS elementa.

Osim ovih elemenata, za ugradnju selenocisteina je neophodno prisustvo još nekih proteina kao što su SECIS vezujućeg proteina 2 (SBP2), Sec specifičnog faktora elongacije (eEFSec), ribozomski L30 protein, Secp43 i SLA protein faktor.

SECIS vezuju i protein 2 (SBP2) je sastavljen od 854 aminokiseline pri čemu gotovo 400 aminokiselina na N terminalnom kraju nema ulogu u inkorporaciji selenocisteina (Copeland i sar., 2001). Uloga ovog proteina je prvo dokazana u *in vitro* uslovima kada je obustavljena sinteza selenoproteina u lizatima ćelija bez SBP2, a ponovo uspostavljena nakon njegovog dodavanja (Copeland i sar, 2000). Papp i sar (2006) su na ćelijskim linijama utvrdili isti efekat prisustva ovog proteina (*in vitro*). Definirano je nekoliko funkcionalnih motiva: N i C terminalni, NLS (*nuclear localization signal*), NES (*nuclear export signals*), domen nepotreban za vezivanje za SECIS, ali neophodan za ugradnju selenocisteina. Međutim, još uvek nije tačno definisan domen za vezivanje za ribozom. SBP2 se preko svog RNK vezujućeg domena (RBD) vezuje za AUGA sekvencu SECIS elementa, a zatim reaguje sa 28S ribozomskom RNK (28S rRNK) (Fletcher i sar, 2001).

Sec specifični faktor elongacije (eEFSec) se može vezati za obe izoforme Sec-tRNK, a formira i komplekse sa SBP2 (Fagegaltier i sar, 2000). Nije utvrđeno gde se tačno formiraju kompleksi između eEFSec i SBP2. Ako se formiraju u jedru, pretpostavka je da u tom slučaju SBP2 olakšava kretanje eEFSec od jedra do ribozoma u citoplazmi. Ukoliko se kompleksi formiraju na ribozomima, vezivanje SBP2 bi dovelo do odvajanja eEFSec na ribozomima i olakšalo prenos Sec-tRNK na UGA kodon. Uloga faktora elongacije je kompleksna, a po svemu sudeći, osim u ugradnji selenocisteina u proteine, učestvuje i u samoj sintezi selenocisteina (Small-Howard i sar., 2006).

Ribozomski L30 protein pripada porodici ribozomskih proteina, a kao i SBP2, ima RNK vezujućeg domen (Moore i sar., 2004) i vezuje se za SECIS element (Chavatte i sar., 2005). Izgleda da se L30 i SBP2 za SECIS element ne vezuju istovremeno. Vezivanjem L30 menja se struktura SECIS elementa i na taj način izaziva oslobađanje SBP2 što kao posledicu ima olakšano prebacivanje Sec-tRNK na aminoacil mesto ribozoma (Chavatte i sar., 2005).



Slika 2.5. Shema sinteze selenoproteina.

2.3.3. Regulacija sinteze selenoproteina

Metabolizam selena je vrlo kompleksan jer je ovaj mikroelement za organizam esencijalan, ali i potencijalno vrlo toksi an. Stoga su neophodni strogi mehanizmi regulacije nivoa selena neophodnog za optimalnu ekspresiju svih selenoproteina. Iako se o sintezi selenoproteina dosta zna, sama regulacija njihove sinteze je nepoznanica. Sintaza selenoproteina je regulisana nivoom selena u hrani, ali zavisi i od tkiva i od toga koji je selenoprotein u pitanju. Zna se da je sinteza svih dvadesetak selenoproteina zavisna od trans-faktora (SBP2, L30), ali nije jasno na koji na in elije daju prioritet za njihovo iskoriš avanje. Protein koji povezuje status selena sa razli itim ekspresijama

selenoproteina je eukariotski faktor inicijacije 4a izoforma 3 (eIF4a3) za koji je u *in vitro* uslovima pokazano da sprečava vezivanje SBP2 za SECIS element iRNK glutation peroksidaze 1 i na taj način inhibira ugradnju selenocisteina u enzim (Budiman i sar., 2009).

Novija istraživanja ukazuju na regulaciju sinteze selenoproteina i na nivou transkripcije, translacije i stabilnosti iRNK. Regulacija na nivou transkripcije je nedovoljno proučena. Brigelius-Flohe i Banning (2006) su nedavno utvrdili da se sinteza GPx2 može regulisati Nrf2/Keap1 (*NF-E2-related factor 2/Kleeh-like ECH-associated protein 1*) sistemom koji reguliše i sintezu proteina zaduženih za detoksikaciju i oksidativnu odbranu, a kojima pripada i tioredoksin reduktaza 1 (TrxR1). Nrf2/Keap1 sistem je jedan od ćelijskih mehanizama za odbranu od oksidativnog stresa (Motohashi i Yamamoto, 2004), a aktiviraju ga elektrofilna jedinjenja, metali, tiolni modifikatori i ostala potencijalno antikancerogena jedinjenja iz hrane (Brigelius-Flohe i Banning, 2006). Moguće je da selen ili njegovi metaboliti aktiviraju ovaj sistem i na taj način utiču na sintezu specifičnih selenoproteina. Postavlja se pitanje da li u DNK uopšte postoji selen regulatorni element koji bi efikasno regulisao transkripciju u odnosu na promenu nivoa selena.

Regulacija sinteze na nivou translacije je komplikovana koliko i sama ugradnja selenocisteina. Naime, poznati su efekti nedostatka nekog od regulacionih proteina koji se vezuju za specifične sekvence u sastavu RNK (Ottaviano i sar., 2009), takozvanih trans-reagujućih faktora (SBP2 i L30) kao i efekti promena specifičnih sekvenci na RNK, takozvanih cis-elemenata (promene SECIS elementa, sec-tRNK), ali taj mehanizam nije poznat.

Ogled Jamesona i Diamonda (2004) je pokazao da je metilovana forma Sec-tRNK aktivna prilikom translacije te da je metilacija Sec-tRNK jedan od mehanizama kontrole sinteze selenoproteina. Utvrđeno je da metilovana forma Sec-tRNK učestvuje u sintezi selenoenzima uključujući u odgovor na oksidativni stres kao što su GPx1 i GPx3, a nemetilovana izoforma učestvuje u sintezi TrxR1 i TrxR2.

Nedavno je utvrđeno (Dumitrescu i sar., 2005) da promene na genu za SBP2 kod ljudi dovode do poremećaja aktivnosti ID2. Takođe su bile smanjene i aktivnosti GPx i nivo Selp u plazmi. Eksperimentišući na ćelijama bubrega embriona deJesus i saradnici (2006) su utvrdili značajno povećanje sinteze selenoenzima kada je bila izražena

prekomerna ekspresija SBP2. Iste godine su Papp i saradnici dokazali da smanjenje količine SBP2 izaziva opšti pad sinteze selenoproteina. Takođe, smanjenje nivoa SBP2 sa ili bez SECp43 i SLA dovodi do opšteg pada sinteze selenoproteina (Xu i sar., 2005).

2.3.4. Uticaj Se na sintezu selenoproteina

Weiss Sachdev i Sunde su 2001. godine uočili da selen utiče na stabilnost iRNK glutation peroksidaze te da se u slučaju njegovog deficita javlja raspad informacione RNK. Takođe, selen utiče na efikasno očitavanje UGA kodona za ugradnju selenocisteina (Fletcher i sar., 2001; Martin i Berry, 2001), reguliše ukupni nivo Sec-tRNK kao i odnos između metilovane i nemetilovane Sec-tRNK (Jameson i sar., 2002; Carlson i sar., 2005).

Hatfield (2001) navodi nekoliko nivoa uticaja selena na ekspresiju selenoproteina: transkripcija, obrada u jedru, prelaz transkripta iz jedra do ribozoma, translacija, stabilnost iRNK i promet selenoproteina.

Proučavajući uticaj selena na regulaciju GPx1, Knight i Sunde (1987) su prilikom izlaganja mladih pacova deficitu selena i korišćenjem anti-GPx1 antitela uočili ekspanziju pad koncentracije GPx1 kao i njene aktivnosti i zaključili da za ovakav pad aktivnosti mora postojati još najmanje jedan faktor osim selena. Prilikom dodavanja selena nakon izazvanog deficita, bilo je potrebno duže vreme kao i veće doze Se da bi se uspostavila puna aktivnost ovog enzima. Deficit selena takođe izaziva pad koncentracije informacione RNK GPx1 u jetri za 90% u odnosu na selenadekvatne jedinke (Saedi i sar., 1988). Kada je posmatrano pri kojim dozama se nakon izazvanog deficita selena javlja puna aktivnost ili koncentracija posmatranog enzima, plato za iRNK GPx1 je dostignut sa 0.05 µg selena/g hrane, a za aktivnost GPx1 sa 0.1 µg selena/g hrane. Treba napomenuti da prilikom nadoknade selena prvo dolazi do povećanja količine iRNK, a zatim do povećanja aktivnosti GPx1. Povećanje koncentracije selena u hrani preko 0.1 µg selena/g ne utiče na regulaciju iRNK i aktivnosti GPx1 (Weiss i sar., 1996).

Aktivnost glutacion peroksidaze eritrocita je kod selendeficitnih jedinki za 60% niža u odnosu na selenadekvatne jedinke, a plato aktivnosti prilikom nadoknade selena nakon izazvanog deficita se takođe dostiže sa 0.1 µg selena/g u hrani.

Prilikom deficita selena aktivnost GPx3 plazme iznosi svega 7-8% aktivnosti enzima kod selenadekvatnih jedinki, a plato nakon nadoknade se postiže sa 0.07 µg selena/g u hrani.

Lei i saradnici (1995) su uo ili da prilikom ishrane pacova veoma niskim koli inama selena (0.002 µg selena/g hrane), aktivnost GPx1 jetre opada za 99% u odnosu na selenadekvatne jedinke, a da aktivnost GPx4 (fosfolipid hidroperoksid glutathion peroksidaza) opada za 59% u odnosu na selenadekvatne jedinke. Plato koji je postignut kod GPx1 sa 0.1 µg selena/g u hrani, kod GPx4 se javio ve sa 0.065 µg selena/g u hrani. Tako e, mere i nivo iRNK za ova dva enzima uo eno je da koncentracija selena nije uticala na nivo iRNK GPx4 te se plato za iRNK GPx4 javio ve na 0.013 µg selena/g u hrani. Ovakav odgovor na deficit i nadoknadu selena nakon izazvanog deficita ukazao je na razli ite mehanizme regulacije ekspresije ova dva enzima u istom tkivu.

Sli ni eksperimenti su vršeni i radi utvr ivanja efekta deficita selena na nivo iRNK jodotironin dejodinaze 1 (ID1) kao i na njenu aktivnost u jetri. Bermanno i saradnici (1995) su kod selendeficitnih pacova uo ili pad aktivnosti ID1 u jetri za 95% pri emu je nivo iRNK ID1 opao za 50%. Nivo iRNK ID1 u štitastoj žlezdi je prilikom deficita selena porastao za 40%. Kako transkripciju ID1 modulira TSH kao odgovor na nivo T3, smatra se da je pove anje nivoa iRNK ID1 u štitastoj žlezdi posledica stimulacije sa TSH.

Pri izlaganju jedinki deficitu selena, zapaža se pad koncentracije selenoproteina P (SeIP) i to za 90% (Burk i Hill, 1994) i njegove iRNK za 33% u odnosu na selenadekvatne jedinke. Koriste i RPA metodu (*ribonuclease protection analysis*), Sunde i saradnici (1998) su uo ili da koncentracija iRNK ovog proteina ne opada dok iRNK GPx1 opada za 85-90% te je zaklju eno da regulacija SeIP ne zavisi zna ajno od promene koncentracije iRNK. Prilikom suplementacije selendeficitnih pacova dolazi do porasta koncentracije SeIP i to pre nego što do e do porasta aktivnosti plazmatske GPx3 i GPx1 u jetri.

Aktivnost tioredoksin reduktaze (TR) kod selendeficitnih jedinki pada na 15% u odnosu na selenadekvatne jedinke pri emu nivo iRNK TR opada za oko 30% (Hadley i Sunde, 2001). Autori su zaklju ili da se regulacija ovog enzima odvija po druga ijem

obrascu u odnosu na GPx1 i GPx4 jer pri deficitu selena dramatično opadaju i aktivnost iRNK GPx1, a kod GPx4 aktivnost opada za 60%, ali nivo iRNK opada za svega 30%.

2.4. Tireoidna osovina, sinteza tireoidnih hormona i regulacija

Sinteza tireoidnih hormona je složen proces koji se odvija delom u štitastoj žlezdi, a delom u ekstratireoidnim tkivima. Kako je jod osnovni mikroelement koji ulazi u sastav tireodnih hormona - jodotironina, adekvatno snabdevanje štitaste žlezde jodom je preduslov za normalnu sintezu samih hormona. Jodid (J^-) se u elije štitaste žlezde unosi pomoću u transmembranskog proteina označenog kao Na^+/I^- simporter (NIS) (Dai i sar., 1996). Ceo proces stimuliše tireotropin (TSH), a inhibiraju tiocianat i perhlorat (Kogai i sar., 1997). Interakcija TSH i njegovog receptora dovodi do aktiviranja adenilat ciklaze preko G-proteina. Sintetisani ciklični AMP utiče na povećanje sinteze NIS-a (Kaminsky i sar., 1994). I sam jodid utiče na sintezu transportera. Smanjene količine jodida inhibiraju ekspresiju iRNK za Na^+/I^- simporter kod pasa (Uyttersprot i sar., 1997). Nakon unosa u tireocite, jod se transformiše iz neorganske forme u organski vezan jod kao sastavni deo tireoidnih hormona. Prvi korak u ovoj transformaciji podrazumeva oksidaciju joda pomoću tireoidne peroksidaze (Magnusson, 1990). Tireoidna peroksidaza (TPO) je glikolizovani hemoprotein vezan za membranu koji oksidovani jod ugrađuje u tirozil ostatke i vrši spajanje dijodotirozil rezidua tireoglobulina u matriksu od kojih se posle formiraju tiroksin i trijodtironin.

Da bi se sintetisani tireoidni hormoni sekretovali, prvo se moraju odvojiti od tireoglobulina. Pod uticajem tireotropina (TSH), formiraju se mikrovili na apikalnoj strani tireocita i tireoglobulin se unosi iz lumena u tireocit, spaja sa lizozomima pri čemu dolazi do njegove proteolize. TSH stimuliše i povećanje aktivnosti lizozomalnih enzima kao što su N-acetil- β -glukozaminidaza, β -galaktozidaza, leucil-naftilaminidaza. Takođe, TSH utiče na povećanje količine iRNK proteaza katepsina B (Phillips i sar., 1989) i katepsina S (Petanceska i Devi, 1992). Nakon proteolize tireoglobulina, tiroksin se delom sekretuje, a delom prevodi u trijodtironin procesom dejodinacije, a hormonski neaktivni mono i dijodtironin se dejodinacijom oslobađaju joda koji se vraća u pul joda tireocita i ponovo se ugrađuje u tireoglobulin u lumenu folikula.

Sinteza hormona štitne žlezde odvija se pod uticajem TSH. TSH se sintetise u prednjem reznju hipofize ili u placenti. Ovaj hormon je glikolizovani protein sastavljen iz nekovalentno vezanih α i β subjedinica. Alfa subjedinica ulazi u sastav još nekih hormona kao što su luteiniziraju i (LH), folikulostimuliraju i (FSH) hormona kao i horionskog gonadotropina (CG), dok je β subjedinica sa karakterističnom aminosekvencijom za svaki od četiri pomenuta hormona. Sama β subjedinica se ne može vezivati za receptore već se mora prvo nekovalentno vezati za α subjedinicu.

Sinteza TSH je regulisana klasičnom negativnom povratnom spregom gde tireoidni hormoni direktno inhibiraju sintezu ovog hormona u hipofizi, a indirektno deluju na nivou hipotalamusa gde redukuju sekreciju tireotropnog oslobađajućeg hormona (TRH).

2.4.1. Selen i funkcija štitaste žlezde

Dickson i Tomlison (1967) su otkrili da štitasta žlezda sadrži više selena po gramu tkiva od bilo kog drugog organa, te da je selen esencijalni element važan za njeno normalno funkcionisanje i homeostazu tireoidnih hormona.

Sinteza tireoidnih hormona podrazumeva jodinaciju tirozil rezidua tireoglobulina koji se nalazi u lumenu folikula štitaste žlezde. Tireoidna peroksidaza (TPO) katalizuje ovu reakciju za koju je potrebna visoka koncentracija vodonik peroksida, a koji je potencijalno veoma štetan za tireocite. Generisanje vodonik peroksida je limitirajućim korakom u sintezi hormona i regulisan dejstvom TSH, (Kimura i sar, 1995). Jodinacija tireoglobulina i generisanje vodonik peroksida se odvija na apikalnoj površini membrane tireocita. Ovakva organizacija omogućava da nastali vodonik peroksid bude visoko dostupan u reakciji jodinacije. Određena količina peroksida koja difunduje u same tireocite biva neutralisana od strane glutation peroksidaze, tioredoksin reduktaze i katalaze (Ekholm i Björkman, 1997).

Tireociti sintetise i sekretuju GPx3. Postoji mogućnost da GPx3 učestvuje u kontroli sinteze tireoidnih hormona regulišući koncentraciju vodonik peroksida. Kada je povećana sinteza tireoidnih hormona signalizirana od strane TSH receptora, porast sinteze vodonik peroksida na apikalnoj membrani tireocita je povezan sa smanjenom

sekrecijom GPx3, te smanjenom degradacijom samog vodonik peroksida (Howie i sar., 1995). Kada proizvodnja tireoidnih hormona opada, opada i sinteza vodonik peroksida, ali raste sekrecija GPx3 koji dodatno smanjuje nivo vodonik peroksida.

Tireociti su konstantno izloženi potencijalno toksičnom efektu vodonik peroksida i lipidnih hidroperoksida. Prilikom deficita selena, smanjuje se količina GPx1 i TR1 u eliji te je smanjena mogućnost odbrane elija od peroksida, a to za posledicu ima oštećenje elija (Demelash i sar., 2004).

2.4.2. Transport tireoidnih hormona

U krvi je za proteine krvne plazme vezano više od 99% tireoidnih hormona. Proteini za koje se vezuju T4 i T3 su tiroksin vezuju i globulin (*thyroxine-binding globulin*-TBG), transtiretin (tiroksin-vezuju i prealbumin), serum albumin i lipoproteini. Vezivanje za ove proteine omogućava konstantno snabdevanje elija i tkiva i sprečava se gubitak ovih hormona putem mokraće (Rasmussen i Rasmussen, 2007). Tiroksin vezuju i globulin (TBG) ima veliki afinitet ka T4 te je 75% tiroksina vezano za TBG. Za transtiretin je vezano 20%, a za serum albumin 5% tiroksina. Trijodtironin se takođe u velikom procentu vezuje za TBG (75%), ali je za transtiretin vezano manje od 5%, a za serum albumin oko 20%.

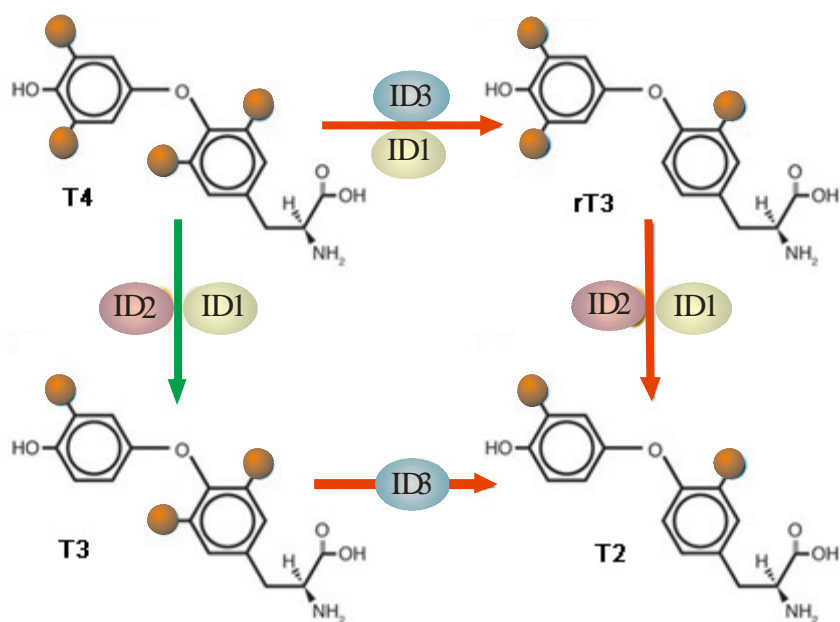
2.4.3. Dejodinaze

Gross i Pitt-Rivers (1951) su utvrdili da se za receptore tireoidnih hormona vezuje T3. Dejodinacija T4 u T3 se smatra prvim korakom u aktivaciji tireoidnog prohormona T4. Dva različita enzima prevode T4 u T3 i to su dejodinaza tipa 1 (jodotironin dejodinaza 1-ID1) i dejodinaza tipa 2 (jodotironin dejodinaza 2 - ID2) koje vrše dejodinaciju spoljnog prstena tiroksina. Dejodinacijom unutrašnjeg prstena inaktivira se T4 pri čemu nastaje reverzni T3 (rT3), a ovaj proces mogu katalizovati ID1 kao i ID3 (Slika 2.6.).

Jodotironin dejodinaza tipa 1 (ID1) obezbeđuje gotovo 80% T3 plazme kod ljudi. Za razliku od ID2, vrlo je osetljiva na dejstvo propiltiouracila (PTU) što je i dokazano u nekoliko eksperimenata (Leonard i Rosenberg, 1978; Visser i sar., 1976; Chopra, 1977). ID1 se nalazi u mnogim tkivima pacova kao što su jetra, bubregi,

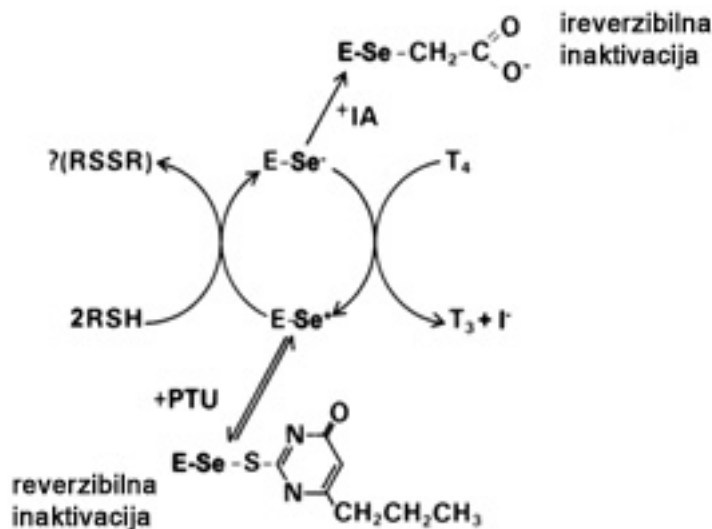
centralni nervni sistem, hipofiza, štitasta žlezda, creva i placenta (Bianco i sar, 2002). Kod ljudi je nema u CNS-u (Campos-Barros i sar., 1996).

Dejodinaza 1 je monomerni integralni membranski protein tipa 1. Dvanaest aminokiselina na N terminalnom kraju je u lumenu endoplazmatskog retikuluma, transmembranski deo se završava sa 36-om aminokiselinom, a ostatak molekula je u citoplazmi (Toyoda i sar., 1995a). Novija istraživanja potvrđuju njegovu lokalizaciju u plazma membrani (Baqui i sar., 2000) elija bubrega i tireocita. S obzirom na položaj katalitičkog centra u citoplazmi i položaj samog molekula u plazma membrani, smatra se da je na ovaj način olakšan pristup cirkulišućim T4 kao i rT3 koji su supstrati za ovaj enzim. Smatra se da je zahvaljujući svojoj lokalizaciji, ID1 glavni proizvođač T3 plazme, a da je ID2 koji je lokalizovan u ER odgovoran za generisanje intracelularnog T3 (Larsen i sar., 1981).



Slika 2.6. Shema aktivacije i deaktivacije tireoidnih hormona pomoću ID1, ID2 i ID3.

Iz istraživanja su pokazala da dejodinacija katalizovana uz pomoć ID1 ima kinetiku 'ping-pong' reakcija sa dva substrata od kojih je prvi jodotironin, a drugi endogeni intracelularni tiolni kofaktor čija hemijska priroda još nije utvrđena (Leonard i Rosenberg, 1980). Propiltiouracil inhibira enzim takođe i se sa ovim tiolnim kofaktorom i formiraju reverzibilni enzim-Se-S-PTU kompleks (Slika 2.7.).



Slika 2.7. Shema mehanizma reakcije katalize aktivacije T4 uz pomoć ID1.

Primarnu ulogu u regulaciji aktivnosti ID1 ima nivo tireoidnih hormona koji povećavaju i aktivnost jodotironin dejodinaze 1 i sintezu njene iRNK (Kaplan i Utiger, 1978; Harris i sar., 1978; Berry i sar., 1990). Toyoda i saradnici (1995b) su utvrdili postojanje TRE (*thyroid response element*) na bočnom regionu ID1 gena, a Jakobs i saradnici (1997) su otkrili postojanje još jednog TR elementa (TRE-2). Retinoin kiselina, derivat vitamina A, povećava ekspresiju ovog proteina verovatno vezivanjem za TRE (Schmutzler i Kohrle 2000). Analizom promotera ID1 gena utvrđeno je ključna uloga hepatocitnog jedarnog faktora 4 (HNF4) u njegovoj aktivaciji, a postojanje proksimalnog HNF4 elementa za odgovor potvrdilo je ovaj nalaz (Stoycheva i Berry, 2009). Toyoda i saradnici (1992) na tireoidnim endokrinih linijama pacova pokazuju da TSH izaziva trostruko povećanje koncentracije iRNK ID1. TNF, IL-1 i interferon snižavaju nivo iRNK ID1 kao i njegovu aktivnost (Pekary i sar., 1994).

Jodotironin dejodinaza tipa 2 katalizuje dejodinaciju spoljnog prstena tiroksina te konverziju T4 u T3 ili rT3 u 3,3'-T2. Kod pacova je zastupljena u hipofizi (Cheron i sar., 1979), mozgu (Crantz i Larsen, 1980; Leonard, 1988) i mrkom masnom tkivu (Silva i Larsen, 1983). Aktivnost ovog enzima je takođe otkrivena i u gonadama pacova, epifizi (Kamiya i sar., 1999), timusu (Molinero i sar., 1995), mlečnoj žlezdi kod miševa (Song i sar., 2000), materici skotnih ženki pacova (Galton i sar., 2001), koronarnim arterijama ljudi, glatkim mišićima aorte (Mizuma i sar., 2001). Kod ljudi je ekspresirana u štitastoj žlezdi (Murakami i sar., 2001; Imai i sar., 2001), srcu, mozgu,

ki menoj moždini, skeletnim miši ima i placenti. Kod pacova je nema u srcu i skeletnim miši ima, a ekspresija u tireoideji adultnih pacova je jako mala (Gereben i sar., 2001).

Dejodinaza 2 je integralni membranski protein iji je amino-terminalni kraj u lumenu endoplazmatskog retikuluma, a karboksi-terminalni kraj u citoplazmi (Baqui i sar., 2000). Za razliku od ID1, neosetljiva je na dejstvo PTU (Salvatore i sar., 1996), ali se, kao i ID1 i ID3, kompetitivno inhibira sa jopanoi nom kiselinom (Germain, 1988a,1988b). U sli nim *in vitro* uslovima, pokazalo se da ID2 ima manju Km za T4 u odnosu na ID1 (Visser i sar., 1982). Dejodinacija pomo u ovog enzima *in vivo* zahteva postojanje redukcionog kofaktora iji identitet nije utvr en (Bianco i sar., 2002).

Izlaganje hladno i pove ava koli inu iRNK za ID2 i aktivnost enzima u mrkom masnom tkivu, a l i adrenergi ki antagonisti spre avaju ovaj efekat (Silva i Larsen, 1983; Salvatore i sar., 1998). U izolovanim adipocitima mrkog masnog tkiva, porast aktivnosti ID2 je zabeležen pri upotrebi norepinefrina, insulina i glukagona, a pad pri upotrebi hormona rasta (Silva i Larsen, 1986a). Cikli ni adenzin monofosfat (cAMP) pove ava aktivnost ID2 u astroglijalnim elijama pacova (Pallud i sar., 1997) kao i nikotin i cikli ni gvanozin monofosfat (Gondou i sar., 1999), tako da ne iznena uje otkri e CRE (*cAMP response element*) na bo nom regionu ID2 gena kod ljudi, pacova i miševa (Canettieri i sar., 2000).

Tireoidni status uti e na ekspresiju ID2 i na pretranslacionom nivou i posttranslacionom nivou (Silva i Larsen, 1986b; Germain, 1985). Viši nivo dejodinacije T4 je zabeležen u kori velikog mozga hipotireoidnih pacova, a pove ava se i koncentracija iRNK za ID2 u mozgu (Burmeister i sar., 1997). Dodavanje T3 je dovelo do opadanja nivoa iRNK za ID2 kod hipotireoidnih pacova dok je T4 primarno smanjivao aktivnost ID2. Kim i saradnici (1998) smatraju da je supresija iRNK za ID2 koju izaziva T3 na nivou transkripcije jer T3 nije uticao na smanjenje poluživota (~2h) iRNK za ID2. U istom istraživanju je u prisustvu reverznog T3 (rT3) uo ena smanjena aktivnost ovog enzima, ali ne i smanjen nivo iRNK za ID2. Poluživot ovog enzima je kratak (50 min), a dodatak nekog od supstrata kao što su T4 i rT3 ga još više skra uje (Koenig i sar., 1984; Leonard i sar., 1984; Silva i Leonard, 1985; Obregon i sar., 1986; Halperin i sar., 1994). Gereben i sar. (2000) navode da se regulacija aktivnosti ovog enzima pomo u T4 i T3 odvija posttranslaciono i da se za ID2 vezuje ubikvitin nakon

ega tako obeležen enzim podleže proteolizi. Koli ina ID2 vezana za ubikvitin raste sa koli inom prisutnog T4.

Uticao selena na aktivnost ID2 je prou avan devedesetih godina. U po etku nije bio svrstan u selenoenzime da bi se u radu Buettnera i saradnika (1999) utvrdilo postojanje SECIS elementa na genu za ovaj enzim.

Beckett i saradnici (1989) 5 nedelja nakon izlaganja pacova deficitu selena zaklju uju da se aktivnost ovog enzima smanjuje i da je to uzrok pove anja koncentracije T4 u krvnoj plazmi. Nivo cirkulišu eg T4 je kontrolisan negativnom povratnom spregom vezanom za sintezu i osloba anje TSH u hipofizi. Ovakav vid kontrole podrazumeva dejodinaciju T4 u samoj hipofizi pomo u ID2. Iako ak i subklini ko pove anje T4 kod hipertireoidizma suprimira TSH, autori nisu uo ili pad koncentracije TSH i pored toga što je pove anje nivoa T4 bilo 70-80%. Na osnovu svojih rezultata su zaklju ili da je mehanizam homeostaze narušen zbog pada aktivnosti ID2 usled nedostatka selena.

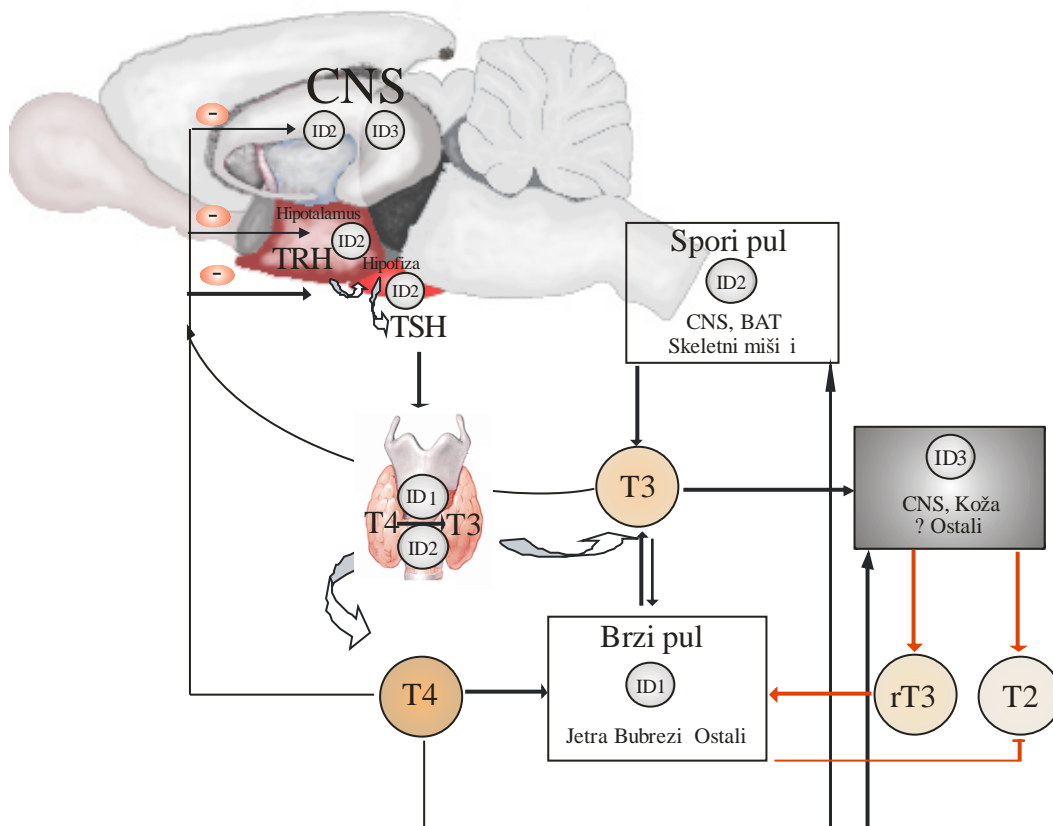
Jodotironin dejodinaza tipa 3 je selenoenzim koji katalizuje dejodinaciju unutrašnjeg prstena tireoidnih hormona pri emu nastaju neaktivni rT3 od T4, odnosno 3,3'-T2 od T3. Prekomerna ekspresija je zapažena u hepati nim hemangiomima, a dovela je do izraženog hipotireoidizma (Huang i sar., 2000). Ovaj enzim štiti tkiva od prekomerne koli ine tireoidnih hormona i na taj na in u estvuje u homeostazi. Prve fiziološke uloge ovog enzima su prou avane u CNS-u pacova (Kaplan i sar., 1981). Osim u centralnom nervnom sistemu, ID3 je zastupljena i u koži, placenti i gravidnom uterusu pacova. Kod neonatalnih pacova, ID3 je zastupljena u skeletnoj muskulaturi, jetri i crevima (Bates i sar., 2000). Tokom embriogeneze ovaj enzim ima veliku ulogu u homeostazi tireoidnih hormona jer izlaganje embriona visokom nivou tireoidnih hormona majke može dovesti do malformacija, poreme enog rasta, mentalne retardacije, pa ak i smrti ploda. Pošto koža adultnih pacova sadrži najve u koli inu rT3, smatra se da ID3 aktivnost u homogenatima kože može biti dobar pokazatelj aktivnosti ovog enzima *in vivo* (Huang i sar., 1985). Dejodinaza 3 je tako e integralni membranski protein (Schoenmakers i sar., 1995).

Aktivnost dejodinaze 3 raste kod hipertireoidizma, a opada u CNS-u pacova tokom hipotireoidizma (Kaplan i Yaskoski, 1980). U svim regijama CNS-a u kojima je zastupljena iRNK za ID3, u zavisnosti od stepena hipertireoidizma, nivo se pove ava i

do 50 puta u odnosu na eutireoidne jedinke, a najizraženije povećanje je u cerebelumu. Još uvek nije jasno da li je ovo povećanje nakon kratkog izlaganja T3 posledica povećane transkripcije gena za ID3, povećane stabilnosti mRNA za ID3 ili kombinacija ova dva faktora. Na kulturama astroglialnih ćelija je takođe potvrđeno povećanje aktivnosti ID3 nakon dodavanja i T4 i T3 u medijum (Esfandiari i sar., 1992). Međutim, aktivnost ID3 nije povećana u placenti hipertireoidnih pacova što ukazuje na različite odgovore gena na povišenje T3 u različitim tkivima (Emerson i sar., 1988).

2.4.4. Uloga dejodinaza u regulaciji tireoidne osovine

Štitasta žlezda oslobađa T4 i T3 pod uticajem tireostimulirajućeg hormona (TSH) iz prednjeg režnja hipofize. Proces je regulisan negativnom povratnom spregom jer povišenje nivoa T4 vrlo brzo dovodi do smanjenog oslobađanja TSH kod hipotireoidnih pacova. Smanjeno oslobađanje TSH počinje 15-30 minuta nakon davanja radioaktivnih T3 ili T4 pri čemu je već 15 minuta nakon aplikacije radioaktivnog T4 uočen radioaktivni T3 vezan za receptore unutar ćelija hipofize. Kako se ceo proces nije inhibirao sa PTU (inhibitor ID1), a nije se mogao objasniti ni količinom radioaktivnog T3 u plazmi, Silva i Larsen (1978) su pretpostavili da postoji neki drugi mehanizam regulacije nivoa TSH. Pretretman jopanoinskom kiselinom (inhibitor ID2), blokirao je generisanje T3 u ćelijama hipofize i biološki efekat T4 na oslobađanje TSH (Larsen i sar., 1979). Kasnija istraživanja su pokazala da je ovakav mehanizam intracelularnog prevođenja T4 u T3 zastupljen u CNS-u i mrkom masnom tkivu (Bianco i Silva, 1987).



Slika 2.8. Shema regulacije lučenja tireoidnih hormona.

Unutar elijska dejodinacija T4 se odvija zahvaljujući i ID2 te je ovaj enzim neophodan za regulisanje fizioloških nivoa T4 i T3 kao i lučenje TSH. Kasnija istraživanja su pokazala da normalizacija nivoa T4 i T3 u plazmi suprimira mRNA tireotropnog oslobađajućeg faktora (TRH) u paraventricularnim jedrima hipotalamusa. Kako TRH stimuliše sintezu i oslobađanje TSH, na taj način se normalizuje i nivo TSH kod tireoidektomisanih pacova (Segerson i sar., 1987). ID2 je zapažena i u tanicitima (Guadano-Ferraz i sar., 1997), ependimskim ćelijama koje se nalaze u bazilarnim moždane komore, a njihovi produžeci prodiru duboko u hipotalamus. Iako nije potvrđeno, izgleda da ove ćelije učestvuju u prenošenju signala do tireotropnih ćelija koje prevode T4 u T3.

2.4.5. Homeostaza T3

Smatra se da štitasta žlezda ljudi lu i T4 i T3 u odnosu 15:1, a da je ova proporcija određena odnosom T4/T3 u tireoglobulinu (Larsen, 1975). Proizvodnja T3 se odvija u dva nezavisna procesa, sekrecijom štitaste žlezde i dejodinacijom u mnogim ekstratireoidnim tkivima koju katalizuju jodotironin dejodinaze 1 i 2. Relativno u većini ekstratireoidnih tkiva u proizvodnji T3 određivano je kod eutireoidnih pacova primenom propiltiouracila (PTU), pri čemu je konverzija T4 u T3 opala za 50% (Oppenheimer i sar., 1972). Kod tireoidektomisanih pacova kojima je dat T4, primena PTU koji blokira ID1, ali ne i ID2, je dovela do pada koncentracije T3 za 50% (Larsen i Frumess 1977) te je zaključeno da ova dva puta podjednako učestvuju u proizvodnji ekstratireoidnog T3.

U krvnoj plazmi pacova je 40% T3 tireoidnog, a 60% T3 ekstratireoidnog porekla. Koncentracija T3 i T4 u krvnoj plazmi je konstantna te su sva tkiva izložena istim koncentracijama T3 i T4. Prema tome, razlika u koncentracijama T3 u različitim tkivima je posledica aktivnosti dejodinaza u njima. Povećanje odnosno smanjenje intracelularne koncentracije T3, a posledično i formiranje kompleksa T3 sa receptorima u jedru, odvija se relativno nezavisno od nivoa hormona u plazmi te uticaj hormona plazme na ciljno tkivo nije uvek isti. Zasićenost receptora u jedru sa T3 u jetri i bubrezima je oko 50%, a u centralnom nervnom sistemu 95% (Crantz i sar., 1982). Kasnije je ova pojava povezana sa aktivnošću ID2 kao glavnog generatora intracelularnog T3. U tkivima hipofize, mozga i mrkog masnog tkiva, u kojima je zastupljena ID2, T3 potiče od intracelularne konverzije T4 u T3. U navedenim tkivima je znatno veća zasićenost receptora (70-90%) pri čemu je čak do 80% vezanog T3 nastalo dejodinacijom T4 unutar ćelija. U tkivu jetre i bubrega u kojima je zastupljena ID1, T3 vezan za receptore je uglavnom poreklom iz krvne plazme (Silva i sar., 1978).

2.4.6. Intracelularna homeostaza T3

Količina T3 u plazmi se brzo uravnotežuje sa većinom ostalih tkiva jer tireoidni hormoni spadaju u relativno male hidrofobne molekule koji lako prolaze kroz ćelijsku membranu putem energetski zavisnih stereospecifičnih procesa (Hennemann i sar., 2001) zavisnih od nekoliko transportera kao što su MCT8 (*monocarboxylate transporter 8*) i MCT10 (*monocarboxylate transporter 10*) (Friesema i sar., 1999, 2003. i 2008.),

transportera aminokiselina, klasi njih multispecifi njih katjon/anjon organskih transportera (Friesema i sar., 1999) i translokaza masnih kiselina (Van der Putten i sar., 2003). Od transportera aminokiselina koji prenose i tireoidne hormone, spominju se sistem L (leucin) i sistem T (triptofan).

Tabela 2.2. Transportni proteini tireoidnih hormona kod pacova (Rasmussen, 2007).

Protein transporter	Tkivo	Hormon
NTCP	jetra, bubrezi	T4, rT3, T3, T2
OATP1A1		
OATP1A4	jetra, bubrezi, retina	T4, T2, T3, rT3
OATP1A5	bubrezi, retina, jetra	T3, T4
OATP1B2	jetra	T3, T4
OATP1C1	mozak	T4, rT3, T3
OATP4A1	mnoga tkiva	T3 (T4, rT3)
OATP4C1		T3 (T4)
OATP6B1	testis	T4, T3
OATP6C1	testis	T4, T3
LAT1	tumori	T2, rT3, T3, T4
LAT2	tumori	T2, rT3, T3, T4
MCT8	oko, hipofiza, druga tkiva	T3, T2, T4, rT3

MCT-monokarboksilatni transporter, OAT-organski anjonski transporteri, NTCP- natrijum tauroholat kotransportni polipeptid.

Sistem L je nezavisan transporter za velike neutralne aminokiseline. U tkivima sisara je veoma zastupljen, a karakterističan je po tome što prenosi i aromatične aminokiseline kao što je triptofan. Postoje L1 i L2 transportni sistemi. Trijodtironin kompetitivno inhibira L1 transportni sistem u kultiviranim astrocitima pacova (Blondeau i sar., 1993). Sistem T je jonski nezavistan transporter koji prenosi aromatične aminokiseline, a da je on odgovoran i za transport tireoidnih hormona pokazano je na eritrocitima (Zhou i sar., 1990).

Nakon ulaska u ciljne ćelije, tireoidni hormoni se vezuju za svoje receptore koji se nalaze u jedru. Regulacija ekspresije različitih gena pomaže u tireoidnih hormona odvija se preko receptora tireoidnih hormona (TR). Receptori tireoidnih hormona pripadaju superfamiliji jedarnih receptora, a do sada je pronađeno nekoliko formi ovih

proteinskih molekula, TR, TR1 i TR2. Efekti aktiviranja receptora na regulaciju genske aktivnosti se postižu vezivanjem za specifične sekvence DNK definisane kao elementi za odgovor na tireoidni hormon (*thyroid hormone response elements-TRE*) u regulatornim regijama ciljnih gena. U odsustvu T3, receptori su vezani za TRE kao monomeri ili kao homodimeri, a najčešće kao heterodimeri sa retinoid X receptorom koji je takođe jedarni receptor. U zavisnosti od prirode TRE, receptor može inhibirati ili aktivirati ekspresiju gena. Receptori imaju 3 domena. Prvi, N-terminalni A/B domen je aktivacioni domen (AF1); drugi, centralno postavljen domen se vezuje za DNK (*DNA binding domain-DBD*); treći domen vezuje ligand (*ligand binding domain-LBD*) i poseduje aktivacioni ligand zavisni domen (AF2). Pomenute forme tireoidnih receptora imaju slične domene za vezivanje DNK i liganda, ali su velike razlike u A/B domenima. Različite forme receptora imaju posebne funkcije. Sindrom rezistencije na tireoidne hormone je izazvan mutacijom na LBD domenu TR1 pri čemu je TR2 nepromenjen.

U većini slučajeva, vezivanje ili otpuštanje liganda ne menja afinitet receptora za vezivanje na DNK već za vezivanje posrednih molekula. Ovi posredni molekuli mogu biti koaktivatori ili korepresori. Od koaktivatora TR receptora treba spomenuti nekoliko proteina iz familije p160 (steroidni receptor koaktivator 1 (SRC), transkripcioni intermedijarni faktor 2); familije p300 (CREB vezuju i *protein-cAMP response element binding protein-binding protein*, p/CAF-CBP associated factor); TRAP (*TR associated protein*). Korepresori su NcoR (*nuclear corepressor*) i SMRT (*silencing mediator for RXR and TR*).

U odsustvu liganda, TR se vezuje za korepresor kompleks koji inhibira transkripciju tako što blokira deacetilaciju histona. Vezivanje liganda izaziva konformacione promene u samom receptoru koji za posledicu ima zamenu korepresor kompleksa koaktivator kompleksom pri čemu neki od njih (p160, CBP/p300 i P/CAF) deluju na histon kao acetiltransferaza što dovodi do remodeliranja samog histona koji aktivira transkripciju (Wu i Koenig, 2000). Multiproteinski kompleks TRAP, koji se vezuje za TR receptore kada je vezan T3, ne deluje na 'remodeliranje' histonskog proteina već reaguje direktno sa TBP (*TATA box binding protein*) i na taj način pojava aktivaciju gena (Yuan i sar., 1998). Za razliku od prethodno navedenih koaktivatora koji su nespecifični, protein NRIF3 (*nuclear receptor-interacting factor 3*) je specifični koaktivator TR (Li i sar, 1999).

Normalna zasi enost T receptora je u ve ini tkiva 40-50% (Oppenheimer, 1979) te se nivo T3 u plazmi tokom hipo- i hipertireoidizma ogleda u promeni zasi enosti receptora u tkivima, a to determiniše biološki efekat tireoidnih hormona na ta tkiva. U ovim tkivima je pretežno eksprimirana ID1. Me utim, u hipofizi, mozgu, mrkom masnom tkivu u kojima je glavni izvor T3 unutar elijska konverzija T4 pomo u ID2, zasi enost receptora je znatno ve a i iznosi 70-90% pri emu je 50-80% vezanog T3 nastalo ovim procesom, a ostatak je poreklom iz plazme (Bianco i Silva, 1987). Položaj jedne i druge dejodinaze može objasniti ovu razliku. ID1 nema zna ajnu ulogu u unutar elijskoj homeostazi T3 pošto je protein plazma membrane te nastali T3 vrlo brzo napušta elije u kojima je zastupljen ovaj enzim. Me utim, ako je u tkivima zastupljena ID2, nastali T3 ne napušta eliju. Uloga ID2 u unutar elijskoj homeostazi je dobro prou ena u mrkom masnom tkivu, hipofizi i mozgu. Poznati su još neki biološki efekti unutar elijske konverzije pomo u ovog enzima kao što su povratna regulacija lu enja TSH, sinteza hormona rasta kod pacova, uticaj na gene uklju ene u adaptivnu termogenezu u mrkom masnom tkivu.

2.4.7. Uticaj Se na sintezu T3 i T4

Deficit selena ima komplekan uticaj na sintezu tireoidnih hormona. Tkiva razli ito reaguju na nedostatak ovog elementa. Tako mozak, hipofiza, štitasta žlezda, nadbubreg i gonade zadržavaju selen i pored smanjenog unosa, dok u krvnoj plazmi, jetri, skeletnim miši ima i srcu njegova koli ina dramati no opada (Bates i sar., 2000). Prema tome, uticaj deficita selena na sintezu selenoproteina kao što su selenodejodinaze i glutatation peroksidaze, zavisi od tkiva u kojem se nalaze. Meinhold i sar. (1992) su uo ili da je aktivnost ID1 u štitastoj žlezdi o uvana, a u jetri opada prilikom nedostatka selena. Kod intaktnih pacova deficit selena je povezan sa porastom koncentracije T4, ali malom promenom koncentracije T3 u serumu, pri emu je koncentracija TSH nepromenjena (Meinhold i sar., 1993; Veronikis i sar., 1996). Tako e, opada aktivnost ID1 u bubrezima što je povezano sa padom nivoa iRNK za ID1. Ovo se me utim ne doga a u jetri gde je zapažen pad u aktivnosti ID1, ali ne i pad koncentracije iRNK za ID1 (DePalo i sar., 1994). Kod ljudi sa deficitom selena je zapaženo blago povišenje T4 i odnosa T3/T4, ali bez porasta nivoa TSH. Pogoršanje tireoidnog statusa nakon dodavanja selena kod ljudi koji su imali udruženi nedostatak joda i selena, a koji se

o itovao u vidu porasta TSH i pada serumskog T3, ukazao je na protektivnu ulogu pada aktivnosti ID1 (Contempre i sar., 1992).

Nekoliko grupa autora je prou avalo uticaj selena na tireoidni status pacova kao i ulogu ID1 jetre i bubrega na produkciju T3 plazme. U svim ovim eksperimentima je pri deficitu selena uo en pad aktivnosti ID1 u jetri i o uvanje aktivnosti ovog enzima u štitastoj žlezdi i hipofizi. Neo ekivao su dobijene male promene nivoa serumskog T3 iako je došlo do blagog pove anja T4 i reverznog T3 (Chanoine i sar., 1992). Ovakav nalaz bio je u neskladu sa procenom da je oko 60% cirkulišu eg T3 poreklom iz jetre i bubrega. Kasnija istraživanja su pokušala da eliminišu ovaj problem te su eksperimenti ra eni na tireoidektomisanim životinjama kojima je dodavan T4. Ovakva prou avanja su analogna eksperimentima sa PTU kod kojih je smanjena ekstratireoidalna konverzija T4 u T3 za 50% (Frumes i Larsen, 1975; van Doorn i sar., 1983). Chanoine i saradnici (1993) su prilikom izazvanog deficita selena smanjili aktivnost ID1 u jetri za 93%, ali i pored toga je bio relativno o uvan nivo T3 u krvnoj plazmi te su na osnovu svojih nalaza zaklju ili da štitasta žlezda proizvodi najve i deo cirkulišu eg T3. U kasnijim istraživanjima, Veronikis i sar. (1996) su uo ili da je prilikom dodavanja T4 tireoidektomisanim pacovima, koncentracija T3 u serumu pala za oko 25%, a pad ukupne proizvodnje T3 je iznosio 32% što je bilo sli no efektu propiltiouracila u istom eksperimentu. Manji pad T3 u odnosu na uobi ajenih 60% ostao je nerazjašnjen.

Nijedan od gore pomenutih eksperimenata nije uzeo u obzir konverziju T4 u T3 pomo u enzima ID2 u tkivima otpornim na deficit selena. Nguyen i saradnici (1998) su tireoidektomisanim pacovima dodavali obeležene T4 i T3 i na osnovu složenih kineti kih merenja zaklju ili da je udeo ID1 i ID2 u produkciji ekstratireoidalnog T3 podjednak.

Mittag i sar. (2010) su u svom eksperimentu na miševima sa mutacijom TR 1 i time izazavanom hipotireozom, prou avali uticaj tireoidnih hormona na metabolizam selena. Kod ovih jedinki se javlja statisti ki zna ajno niža koncentracija selena u cirkulaciji u odnosu na kontrolu s tim što se nakon aplikacije T3 i kod mutanta i kod kontrole nivo serumskog selena pove ava za 20%. Osim toga, nakon tretmana sa T3, došlo je do smanjenja aktivnosti GPx1 u jetri mutanata i kontrolnih životinja. Aktivnost GPx3 oglednih jedinki se nije menjala dodavanjem T3 dok je koli ina sep P statisti ki zna ajno porasla.

3. Cilj i zadaci istraživanja

Imajući u vidu navedene činjenice, istraživanje je bilo usmereno ka sledećim ciljevima i zadacima:

1. Da se prati uticaj deficita selena i blokatora dejodinaza na telesnu masu juvenilnih pacova.
2. Da se utvrdi uticaj deficita selena i blokatora dejodinaza na funkciju tireoidne osovine, odnosno nivo S_{3} i S_{4} u krvi pacova.
3. Da se utvrdi status selena kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki određivanjem koncentracije selena u krvi pacova.
4. Da se utvrdi status selena kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki uz primenu blokatora dejodinaza (PTU i jopanoinske kiseline) određivanjem koncentracije selena u krvi pacova.
5. Da se utvrdi aktivnost selenoenzima glutacione peroksidaze 1 u eritrocitima i glutacione peroksidaze 3 u krvnoj plazmi selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki.
6. Da se utvrdi aktivnost selenoenzima glutacione peroksidaze 1 u eritrocitima i glutacione peroksidaze 3 u krvnoj plazmi selenadekvatnih i selendeficitnih pacova uz primenu blokatora dejodinaza.
7. Da se dobijeni rezultati statistički obrade.

4. Materijal i metode rada

Pri izradi plana oglada i izbora metoda uzeti su u obzir ciljevi i zadaci rada, kao i odgovaraju i podaci iz literature.

4.1. Materijal

4.1.1. Izbor materijala

U cilju ispitivanja uticaja blokatora dejodinaza na parametre tireoidne osovine kod selen-adekvatnih i selendeficitnih juvenilnih pacova, organizovan je ogled po grupno-kontrolnom sistemu u Agenciji za lekove u Beogradu. Za ogled su koriš eni Wistar pacovi stari 21 dan, prose ne telesne mase 48.6 ± 7.8 g, poreklom od “Charles-River”, Ma arska. Ispitivanja su izvedena na jedinkama muškog pola.

U metalne kaveze su smeštene po 4 životinje, pri emu je prostorija imala dvanaesto asovni svetlosni režim sa prose nom temperaturom vazduha 24 ± 1 °C. Hranjenje i napajanje su bili *ad libitum*.

4.1.2. Eksperimentalni protokol

Ogled je izveden na ukupno 128 pacova podeljenih u osam jednakih grupa od po 16 jedinki. Pola oglednih životinja (8 jedinki po grupi) je u eksperimentu bilo 3 nedelje, a druga polovina 7 nedelja. Formirane su slede e ogledne grupe:

Grupa	1	2	3	4	5	6	7	8
Tretman	Se ⁺	Se ⁺	Se ⁺	Se ⁺	Se ⁻	Se ⁻	Se ⁻	Se ⁻
	PTU ⁻	PTU ⁺	PTU ⁺	PTU ⁻	PTU ⁻	PTU ⁺	PTU ⁺	PTU ⁻
	IA ⁻	IA ⁺	IA ⁻	IA ⁺	IA ⁻	IA ⁺	IA ⁻	IA ⁺

Selenadekvatna grupa, netretirana blokatorima (Se⁺PTU⁻IA⁻), tokom oglada je posmatrana kao kontrolna grupa.

Grupe sa oznakom Se⁺ (1, 2, 3 i 4) su dobijale hranu za pacove koja je sadržala 0.334 mg selena po kilogramu hrane, a grupe sa oznakom Se⁻ (5, 6, 7 i 8) su hranjene selendeficitnom hranom (0.031 mg selena/kg hrane). Sastav kontrolne i selendeficitne hrane su prikazani u tabeli 4.1.1.

Grupe 2,3,6 i 7 (PTU⁺) su preko vode za pi e dobijale propiltiouracil (PTU). Koncentracija PTU u vodi za pi e je bila 150 mg/l, pri emu je svaki dan pravljen svež rastvor. Zbog gorkog ukusa PTU u vodu je dodavan vešta ki zasla iva . Grupe sa oznakom PTU⁻ su napajane normalnom vodom za pi e.

Jedinkama iz grupa 2, 4, 6 i 8 (IA⁺) je svakih sedam dana intraperitonealno aplikovana jopanoi na kiselina u dozi 6 mg/100 g TM.

Tokom oglada su svakih sedam dana vršena kontrolna merenja telesne mase pacova. Na kraju oglada jedinke su uvedene u etarsku anesteziju, a zatim je kardijalnom punkcijom uzeto 3-5 ml krvi. Deo krvi je koriš en za odre ivanje koncentracije selena i aktivnosti citosolne glutathion peroksidaze (GPx1), a deo za dobijanje plazme nakon centrifugovanja u epruvetama na 3000 obrtaja/min tokom 20 minuta. Kao antikoagulaciono sredstvo je koriš en heparin (15 IJ heparina po ml krvi). Iz plazme je odmah odre ivana aktivnost glutathion peroksidaze (GPx3), a ostatak plazme je zamrznut na -20⁰C da bi se kasnije odredile koncentracije hormona T3, T4 i TSH.

4.1.3. Ishrana pacova

Pacovi su hranjeni specijalnim gotovim smešama za ishranu pacova proizvo a a Altromin (Nema ka) i to kontrolnom C-1000 (grupe 1,2,3 i 4) i selendeficitnom C-1045 (grupe 5,6,7 i 8) iji je hemijski sastav prikazan u tabelama 4.1.1. i 4.1.2.

Tabela 4.1.1. Hemijski sastav hrane za pacove (Altromin)

Hemijski sastav	Kontrolna hrana (C-1000)	Selendeficitna hrana (C-1045)
Metaboli ka energija	3518.1	3502.9
Sirovi proteini (%)	17.61	17.33
Sirova mast (%)	5.08	6.02
Sirova vlakna (%)	4.04	3.53
Sirov pepeo (%)	5.49	5.52
Kalcijum g/kg	9.53	9.25
Fosfor g/kg	14.74	14.7
Lizin g/kg	17.4	11.5
Metionin + Cistin	13.89	13.8

Tabela 4.1.2. Količina vitamina i mikroelemenata mg/kg (Altromin)

Ingredijent	C-1000	C-1045	Ingredijent	C-1000	C-1045
Vitamin A IU./kg	15 000	16 500	Magnezijum mg/kg	739.8	769.27
Vitamin D ₃ IU/kg	500	550	Natrijum mg/kg	2500.16	2466.2
Vitamin E mg/kg	163.9	165.0	Kalijum mg/kg	7171.34	9202.9
Vitamin K ₃ mg/kg	10.00	11.00	Bakar mg/kg	5.641	8.426
Vitamin B ₁ mg/kg	20.04	22.00	Gvožđe mg/kg	178.58	174.31
Vitamin B ₂ mg/kg	20.32	22.00	Cink mg/kg	29.30	46.73
Vitamin B ₆ mg/kg	15.03	16.50	Mangan mg/kg	100.89	98.99
Vitamin B ₁₂ mg/kg	0.04	0.033	Jod mg/kg	0.450	0.410
Nikotinska kis. mg/kg	50.17	55.00	Kobalt mg/kg	0.147	0.147
Pantotenska kis. mg/kg	50.11	55.00	Selen mg/kg	0.334	0.031
Folna kiselina mg/kg	10.01	11.00			
Holin hlorid mg/kg	1 011.5	1 100.0			
Biotin mg/kg	0.2	0.4			
Vitamin C mg/kg	20.00	22.00			

4.2. Metode

4.2.1. Određivanje parametara tireoidne osovine

Procena tireoidnog statusa ispitivanih jedinki vršena je na osnovu vrednosti koncentracija trijodtironina (T3), tiroksina (T4) i tireostimulirajućeg hormona (TSH).

4.2.1.1. Određivanje koncentracije T3 i T4

Za određivanje koncentracija slobodnog i vezanog trijodtironina (T3) i tiroksina (T4) korišteni su komercijalni RIA kitovi (INEP, Zemun). Test se zasniva na kompetitivnom vezivanju serumskog T3 i T4 i radioaktivno obeleženih T3 i T4 za mali, ali određeni broj epitopa na specifičnim anti-T3 i anti-T4 antitelima, pri čemu nastaju obeleženi i neobeleženi imunokompleksi. Ukoliko ima više serumskog T3 i T4, formira

se manje obeleženog kompleksa. Posle završene reakcije svi nastali kompleksi su taloženi polietilenglikolom (PEG) dok su slobodni obeleženi i neobeleženi T3 i T4 kao i slobodna antitela zaostala u te noj fazi. Radioaktivnost taloga merila se gamascintilacionim broja em CompuGamma LKB, Belgija. Istovremeno sa uzorcima seruma su tretirani i standardi koji sadrže razli ite, ali ta no definisane koncentracije T3 i T4. Na osnovu o itanih vrednosti standarda je formirana standardna kriva pomo u koje su odre ivane koncentracije T3 i T4 u uzorcima.

4.2.1.2. Odre ivanje koncentracije TSH

Za odre ivanje koncentracija tireotropnog hormona (TSH) u plazmi oglednih životinja koriš en je RIA kit (MP Biomedicals, Belgija). Test se zasniva na kompetitivnom vezivanju TSH i radioaktivno obeleženog ¹²⁵I-TSH za epitope visokospecifi nih poliklonskih ze ijih antiTSH antitela. Zbog konstantnih koncentracija obeleženog TSH i anti-TSH antitela, koli ina nagra enih imunokompleksa je zavisila od koncentracije TSH u uzorku plazme. Nakon inkubacije su se odvajali slobodni i vezani TSH dodavanjem sekundarnog antitela (mišije monoklonsko anti ze ije IgG antitelo). Radioaktivni imunokompleksi su precipitovani centrifugiranjem nakon ega je o itavana radioaktivnost gamascintilacionim broja em CompuGamma LKB, Belgija. Istovremeno sa uzorcima seruma su tretirani i standardi koji sadrže razli ite, ali ta no definisane koncentracije TSH. Na osnovu o itanih vrednosti standarda je formirana standardna kriva pomo u koje su odre ivane koncentracije TSH u uzorcima.

4.2.2. Odre ivanje parametara statusa selena

Status selena eksperimentalnih jedinki procenjivan je na osnovu koli ine selena u punoj krvi i na osnovu aktivnosti glutathion peroksidaze u plazmi (GPx3) i aktivnosti citosolne glutathion peroksidaze (GPx1) u eritrocitima.

4.2.2.1. Odre ivanje koncentracije selena u punoj krvi

Koncentracija selena u punoj krvi pacova je odre ivana hidridnom tehnikom na atomskom absorpcionom spektrofotometru. Selen je iz organske materije preveden u

neorgansko stanje mikrotalasnom digestijom u mikrotalasnoj pe i Milestone, model Touch Control. Svaki uzorak je izmeren i preliven sa 8 mL koncentrovane azotne kiseline i 2 mL 30% vodonik peroksida. Smesa je u teflonskoj kiveti izlagana temperaturi od 180⁰C tokom 15 minuta po predefinisanim temperaturnom programu. Nakon destrukcije organske materije, sadržaj kivete je prenesen u normalni sud od 25 mL i dopunjen sa 5M hlorovodoničnom kiselinom. U ovako pripremljenom uzorku selen je bio u obliku Se(VI). Zagrevanjem sa 5M HCL došlo je do redukcije Se (VI) u Se(IV) koji sa NaBH₄ stvara SeH₄. Koncentracija nastalog SeH₄ se određuje atomskom apsorpcijom. Analiza je izvedena na uređaju Thermo electron Solaar AA, Series 4, sa VP70 hidridnim modulom i električnim zagrevanjem kvarcne kivete pomoću EC 90 pe i. Uzorci su u hidridni modul unášeni pomoću AS 2000 autosamplera. Nosilac i gas za SeH₄ bio je argon isto e 4.8 sa protokom od 250 mL/min. Stabilizaciono vreme hidridnog modula tokom građenja hidrida bilo je 50 sekundi po uzorku, merenje apsorpcije je vršeno u tri replikata po 4 sekunde, a išćenje sistema i priprema za sledeći uzorak je trajalo 60 sekundi. Kvarcna kiveta je zagrevana na 900⁰C. Apsorpcija je merena na 196 nm. Merenje apsorpcije je izvedeno uz pozadinsku korekciju sa deuterijumovom lampom. Kontrola kvaliteta je izvedena merenjem 3 standardna rastvora selena (5, 10 i 20 ug/L), izradom kalibracione prave i jedne prave. Korelacioni koeficijent standardne prave je bio 0.998. Standardni rastvori su injektovani na početku i na kraju svakog analitičkog lota. Kontrola kvaliteta je takodje izvođena analiziranjem sertifikovanog referentnog materijala BCR 185 (IRMM, Belgija). Dobijene vrednosti za replikate su bile u okvirima sertifikovane vrednosti.

4.2.2.2. Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze u punoj krvi i plazmi

Aktivnost citosolne glutacion peroksidaze (GPx1) i glutacion peroksidaze krvne plazme (GPx3) određivana je metodom po Günzler i sar. (1974) na spektrofotometru Cecil 2000, sa vodenim kupatilom i termostatom sa stalnom temperaturom pri merenju od 37⁰C. Princip merenja je baziran na spektrofotometrijskom registrovanju potrošnje NADPH u kuplovanom enzimskom sistemu. U ovom nizu reakcija GPx prisutna u uzorku pune krvi vrši redukciju tercijarnog butil hidroperoksida (TBH). Glutacion se, kao neposredni davalac vodonika, oksiduje u GS-SG. U drugoj fazi oksidovani glutacion

(GS-SG) se regeneriše u redukovani oblik pomoću NADPH. Stabilnost koncentracije redukovanog glutationa (GSH) održava se tako što se sistemu dodaje enzim glutation reduktaza (GR) (E.C.1.6.4.2.). Dva minuta pošto reakcija počinje dodavanjem TBH, brzina potrošnje NADPH se registruje u intervalima po 60 sekundi tokom 3 minuta na talasnoj dužini od 366 nm. Razlika u brzini potrošnje NADPH između uzorka i slepe probe predstavlja aktivnost GPx. Slepa proba sadrži date reagense u istim količinama, ali bez prisustva uzorka.

Rastvori GR, GSH i NADPH (Sigma-Aldrich) uvek su sveže pripremani uz korišćenje redestilovane vode kao rastvarača a za GR i GSH, odnosno 0.1% NaHCO₃ za NADPH. Sastav neophodnih reagenasa i njihove koncentracije prikazani su u tabeli 4.3.

U epruvetu je sipano 500 µl kalijum fosfatnog pufera koji obezbeđuje optimalni pH sredine (pH=7) za delovanje GPx. Zatim je dodato 200 µl glutationa (GSH), 50 µl glutation reduktaze (GR), 20 µl pune krvi hemolizovane Drapkinovim reagensom (razblaženje 11 puta) i 480 µl redestilovane vode. Rastvor je preinkubiran u vodenom kupatilu 10 minuta na 37°C nakon čega je dodato 200 µl redukovanog koenzima (NADPH) i 550 µl TBH. Nakon 2 minuta od početka reakcije vršeno je merenje potrošnje NADPH u intervalima od 30 sekundi.

Aktivnost plazmatske glutation peroksidaze (GPx3) određivana je istom postupkom pri čemu je količina uzorka plazme bila 5 µl.

Niska koncentracija TBH (< 2,32 mmol) koja je korišćena u ovoj metodi omogućava da se meri samo aktivnost selenzavisne glutation peroksidaze (Burk i sar., 1978).

Tabela 4.3. Sastav reagenasa koji su korišteni za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti GPx.

Reagensi	Zapremina (μl)	Kona na koncentracija
Kalijum fosfatni pufer (400 mmol/L, pH 7,0)	500	100 mmol/L
EDTA (16 mmol/L)		4 mmol/L
GSH (604 mmol/L)	200	6 mmol/L
Glutation reduktaza (GR)	50	0,375 IJ/ml
Puna krv (razbl. 11x); plazma	20;5	
Redestilovana voda	480; 495	
10 minuta preinkubacija na 37°C		
NADPH (3 mmol/L u 0,1% NaHCO ₃)	200	0,3 mmol/L
Tercijarni butil-hidroperoksid (6,3 nmol/L)	500	1,575 mmol/L
Start reakcije		
Posle 2 minuta, registrovanje potrošnje NADPH na 366 nm		

4.3. Statistička obrada podataka

Rezultati dobijeni u ovom ogledu su grupisani u odgovarajuće statističke serije i obrađeni uz primenu nekoliko matematičkih metoda korišćenjem programa MS Excel 2007 i GraphPadPrism5. U radu su primenjene sledeće metode: mere varijacije i metod dvofaktorske analize varijanse sa Bonferoni testom.

Mere varijacije su omogućile da se prati varijabilitet unutar svakog obeležja, kako apsolutno, tako i relativno, a preko koeficijenta varijacije i poređenja varijacija između obeležja. Analize značajnosti statističkih razlika između pojedinih tretmana izvršene su Student t-testom na nivou rizika od 5%, 1% i 0,1%, pa su i zaključci dati sa odgovarajućom verovatnošću (95%, 99% i 99.9%).

Dobijeni i obrađeni rezultati su prikazani numerički u vidu tabela, a u cilju vizuelne komparacije eksperimentalno utvrđenih numeričkih vrednosti korišćeni su histogrami.

Za ocenu korelacionih parametara korišćena je Pearson-ova tablica koeficijenata korelacije.

5. Rezultati

5.1. Telesne mase pacova

Merenje telesne mase oglednih životinja vršeno je svakih sedam dana od ulaska jedinki u ogled. Na početku eksperimenta (0 dan) izmerna je masa svih oglednih životinja i u proseku je iznosila $48,6 \pm 7,8$ g. Zatim su formirane grupe sa ujednaenim telesnim masama. Ve nakon nedelju dana selendeficitne jedinice tretirane propiltiouracilom (ogledna grupa 7) su imale statisti ki zna ajno nižu telesnu masu ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 5.1.1.). Ovakav trend se nastavio druge i tre e nedelje pri emu su razlike u telesnoj masi izme u ovih grupa postale statisti ki još zna ajnije ($p < 0,001$). Nakon tri nedelje su sve selendeficitne grupe imale statisti ki zna ajno manju prose nu telesnu masu od kontrolne grupe. Posle pet nedelja tretmana, grupe koje su preko vode dobijale PTU (2, 3, 6 i 7) su imale statisti ki zna ano niže telesne mase od kontrolne grupe pri emu su selendeficitni pacovi (6 i 7) imali duplo manje telesne mase u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon sedam nedelja tretmana, grupe tretirane sa PTU su imale statisti ki zna ajno niže telesne mase u odnosu na kontrolnu grupu na nivou zna ajnosti $p < 0,001$. Selendeficitne jedinice tretirane sa jopanoi nom kiselinom (IA) su imale prose no istu telesnu masu kao i selendeficitne jedinice koje nisu dobijale blokator. Tako e, selenadekvatne jedinice tretirane sa IA su imale sli ne telesne mase kao i kontrolna grupa.

Tabela 5.1.1. Prose na telesna masa ($\bar{X} \pm SD$) pacova tokom trajanja ogleda 7 nedelja (g).

<u>Grupa</u>		<u>Nedelja</u>							
		0	1	2	3	4	5	6	7
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	49,2±8,7	82,1±12,0	125,0±14,3	176,1±19,2	197,2±19,4	218,5±18,5	253,6±22,0	289,8±26,5
	PTU ⁺ IA ⁺	51,0±8,0	83,1±10,6	117,5±12,5	156,6±13,6	183,4±18,1	189,0±13,5 ^b	206,1±12,9 ^c	220,6±11,0 ^c
	PTU ⁺ IA ⁻	52,4±10,3	85,6±9,7	125,0±12,5	160,0±17,8	193,0±16,6	194,8±19,1 ^a	209,2±22,8 ^c	233,9±27,9 ^c
	PTU ⁻ IA ⁺	48,2±8,2	81,7±12,2	127,0±16,3	177,6±17,5	202,8±28,8	215,6±25,8	239,1±21,8	288,6±26,5
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	53,6±6,0	75,8±7,2	108,9±9,8 ^b	154,5±14,2 ^b	187,1±15,0	197,5±14,7 ^a	234,7±16,2 ^a	267,0±17,4 ^a
	PTU ⁺ IA ⁺	54,7±7,0	75,3±9,1	99,9±10,7 ^c	119,1±12,6 ^c	133,5±10,1 ^c	124,8±8,9 ^c	124,5±9,3 ^c	128,7±7,7 ^c
	PTU ⁺ IA ⁻	48,5±6,1	68,5±8,1 ^b	92,5±9,3 ^c	112,9±12,2 ^c	121,0±10,5 ^c	111,3±9,0 ^c	116,1±13,2 ^c	119,7±14,4 ^c
	PTU ⁻ IA ⁺	53,0±6,7	74,4±6,5	107,2±9,1 ^b	152,2±11,7 ^c	188,5±20,9	199,6±19,5 ^a	223,1±19,7 ^b	267,8±26,6
				a-p<0,05	b-p<0,01	c-p<0,001			

Analiziraju i uticaj selena i blokatora na telesne mase metodom dvofaktorske analize varijanse, uo en je zna ajan uticaj oba faktora samostalno i u interakciji, nakon tri i nakon sedam nedelja tretmana (Tabela 5.1.2.).

Tabela 5.1.2. F vrednosti i zna ajnost uticaja selena i blokatora dejodinaza na telesne mase pacova (dvofaktorska analiza varijanse- *two-way ANOVA*).

	<u>3 nedelje</u>	<u>7 nedelja</u>
Blokatori	4,58 (p<0,001)	124,5 (p<0,001)
Status selena	146,30 (p<0,001)	138,3 (p<0,001)
Blokatori x Se	35,25 (p<0,01)	20,26 (p<0,001)

5.2. Koncentracija tiroksina (T4)

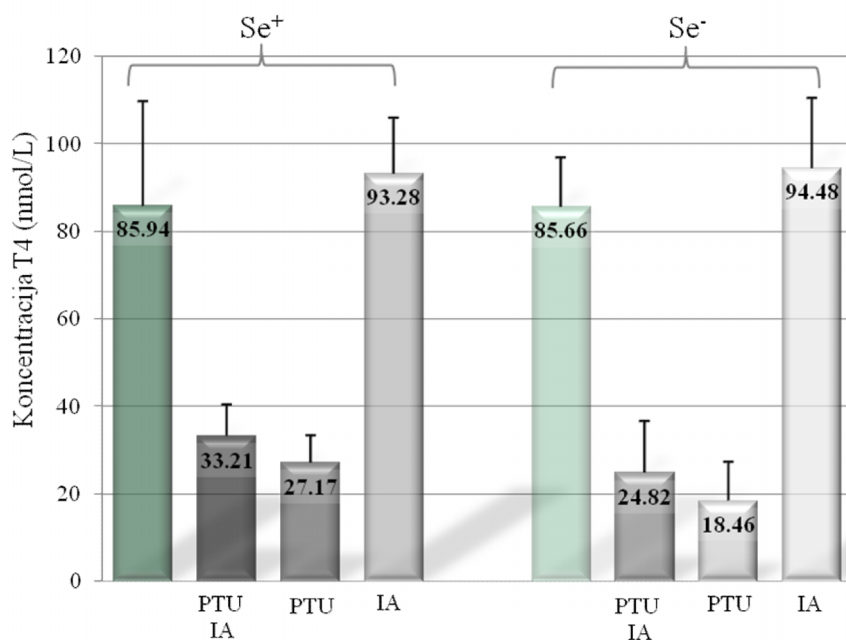
Nivo tiroksina u krvnoj plazmi ispitivanih grupa se nakon tronedelnog tretmana kretao od $18,46 \pm 8,74$ nmol/L do $94,48 \pm 15,89$ nmol/L (Tabela 5.2.1., Grafikon 5.2.1.). Grupe koje su dobijale propiltiouracil ($\text{Se}^+\text{PTU}^+\text{IA}^+$, $\text{Se}^+\text{PTU}^+\text{IA}^-$, $\text{Se}^-\text{PTU}^+\text{IA}^+$ i $\text{Se}^-\text{PTU}^+\text{IA}^-$) su imale izrazito niže koncentracije T4 u odnosu na grupe koje su napajane vodom bez PTU.

Tabela 5.2.1. Koncentracija tiroksina (T4) u krvnoj plazmi pacova nakon tretmana 3 i 7 nedelja (nmol/L).

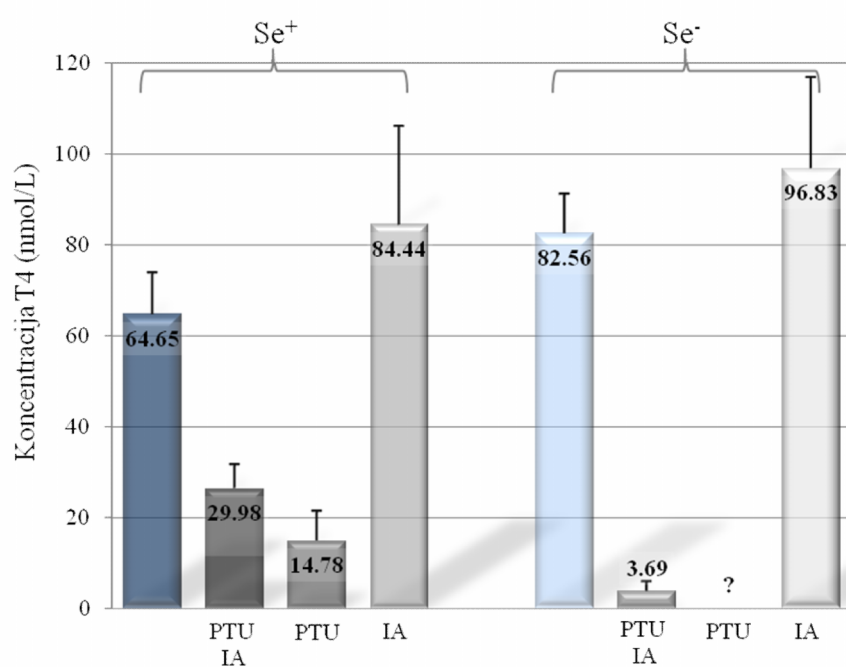
Grupa	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	
<u>3 nedelje</u>							
Se+	PTU⁻ IA⁻	7	85,94	23,689	10,594	27,56	51,26-115,16
	PTU⁺ IA⁺	7	33,21	6,977	2,848	21,01	23,97-43,85
	PTU⁺ IA⁻	7	27,17	6,072	2,146	22,35	17,51-32,75
	PTU⁻ IA⁺	7	93,28	12,513	4,729	13,41	76,91-112,68
Se-	PTU⁻ IA⁻	7	85,66	11,053	4,512	12,90	73,09-103,25
	PTU⁺ IA⁺	8	24,82	11,601	4,385	46,75	11,13-41,98
	PTU⁺ IA⁻	7	18,46	8,736	3,907	47,32	10,67-28,12
	PTU⁻ IA⁺	8	94,48	15,892	5,616	16,82	66,51-114,55
<u>7 nedelja</u>							
Se+	PTU⁻ IA⁻	8	64,65	9,067	3,204	14,03	52,05-75,57
	PTU⁺ IA⁺	8	29,98	5,141	2,571	17,15	23,25-38,93
	PTU⁺ IA⁻	8	14,78	6,477	2,896	43,81	6,20-27,27
	PTU⁻ IA⁺	7	84,44	21,582	10,791	25,56	55,56-109,53
Se-	PTU⁻ IA⁻	8	82,56	8,542	3,487	10,35	68,22-99,85
	PTU⁺ IA⁺	5	3,69	2,095	1,048	56,77	1,65-6,98
	PTU⁺ IA⁻	8	<5	/	/	/	/
	PTU⁻ IA⁺	8	96,83	20,065	7,584	20,72	82,16-136,50

Sli na situacija je zabeležena i sedme nedelje, kada su koncentracije T4 selendeficitnih jedinki tretiranih sa PTU bile toliko niske da su izašle iz opsega merljivosti koriš enih RIA kitova (Grafikon 5.2.2.). Nakon sedam nedelja tretmana

najviša prose na koncentracija tiroksina je zabeležena u oglednoj grupi $\text{Se}^-\text{PTU}^-\text{IA}^+$ i iznosila je $96,83 \pm 20,06$ nmol/L.



Grafikon 5.2.1. Koncentracija tiroksina (T4) u krvnoj plazmi oglednih pacova nakon 3 nedelje tretmana (nmol/L).



Grafikon 5.2.2. Koncentracija tiroksina (T4) u krvnoj plazmi oglednih pacova nakon 7 nedelja tretmana (nmol/L).

Analiziraju i uticaj selena i blokatora dejodinaza na koncentraciju tiroksina u krvi metodom dvofaktorske analize varijanse, uo en je snažan uticaj blokatora nakon tri nedelje tretmana ($p < 0,001$), a nakon sedam nedelja, blokatori su samostalno i u interakciji sa selenom uticali na koncentraciju T4 (Tabela 5.2.2.).

Tabela 5.2.2. F vrednosti i zna ajnost uticaja selena i blokatora dejodinaza na koncentraciju tiroksina (T4) u krvnoj plazmi pacova (dvofaktorska analiza varijanse- two-way ANOVA).

	<u>3 nedelje</u>	<u>7 nedelja</u>
Blokatori	114,3 ($p < 0,001$)	175,2 ($p < 0,001$)
Status selena	1,357 ($p > 0,05$)	0,399 ($p > 0,05$)
Blokatori x Se	0,568 ($p > 0,05$)	11,36 ($p < 0,001$)

Statisti ki zna ajno niže koncentracije T4 ($p < 0,001$) nakon tronedeljnog i sedmonedeljnog tretmana zabeležene su u selenadekvatnim grupama kao i selendeficitnim grupama, tretiranim sa PTU. Kod jedinki koje su u eksperimentu bile sedam nedelja, statisti ki zna ajno pove anje koncentracije T4 u odnosu na kontrolnu grupu je zabeleženo kod selenadekvatnih i selendeficitnih grupa tretiranih jopanoi nom kiselinom (Tabela 5.2.3.)

Tabela 5.2.3. Značajnost razlika u vrednostima koncentracija tiroksina (T4) u krvnoj plazmi pacova nakon tretmana 3 i 7 nedelja, Studentov t-test (nsz-nije statisti ki zna ajno, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

		3 nedelje							
		Se+				Se-			
		PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
Se+	PTU ⁻ IA ⁻		***	***	nsz	nsz	***	***	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺			nsz	***	***	nsz	**	***
	PTU ⁺ IA ⁻				***	***	nsz	nsz	***
	PTU ⁻ IA ⁺					nsz	***	***	nsz
Se-	PTU ⁻ IA ⁻						***	***	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺							nsz	***
	PTU ⁺ IA ⁻								***
	PTU ⁻ IA ⁺								
		7 nedelja							
		Se+				Se-			
		PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
Se+	PTU ⁻ IA ⁻		***	***	nsz	nsz	***	***	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺			nsz	***	***	nsz	**	***
	PTU ⁺ IA ⁻				***	***	nsz	nsz	***
	PTU ⁻ IA ⁺					nsz	***	***	nsz
Se-	PTU ⁻ IA ⁻						***	***	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺							nsz	***
	PTU ⁺ IA ⁻								***
	PTU ⁻ IA ⁺								

Značajnost razlika u koncentracijama T4 u krvnoj plazmi pacova između u jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja prikazana je u tabeli 5.2.4. Dužina tretmana je uticala na pad koncentracije T4 pri čemu je statisti ki zna ajan pad uo en u kontrolnoj grupi kao i u ogleđnim grupama 3, 6 i 7. Statisti ki najzna ajniji pad koncentracije T4 je zabeležen u selendeficitnoj grupi tretiranoj propiltiouracilom.

Tabela 5.2.4. Značajnost razlika u koncentracijama tiroksina (T4) u krvnoj plazmi pacova između u jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja, Studentov t-test.

Se+				Se-			
PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
p<0,05	nsz	p<0,01	nsz	nsz	p<0,01	p<0,001	nsz

5.3. Koncentracija trijodtironina (T3)

Prose ne vrednosti koncentracije trijodtironina (T3) u krvnoj plazmi pacova ispitivanih grupa kao i mere varijacije ovog parametra prikazane su u tabeli 5.3.1.

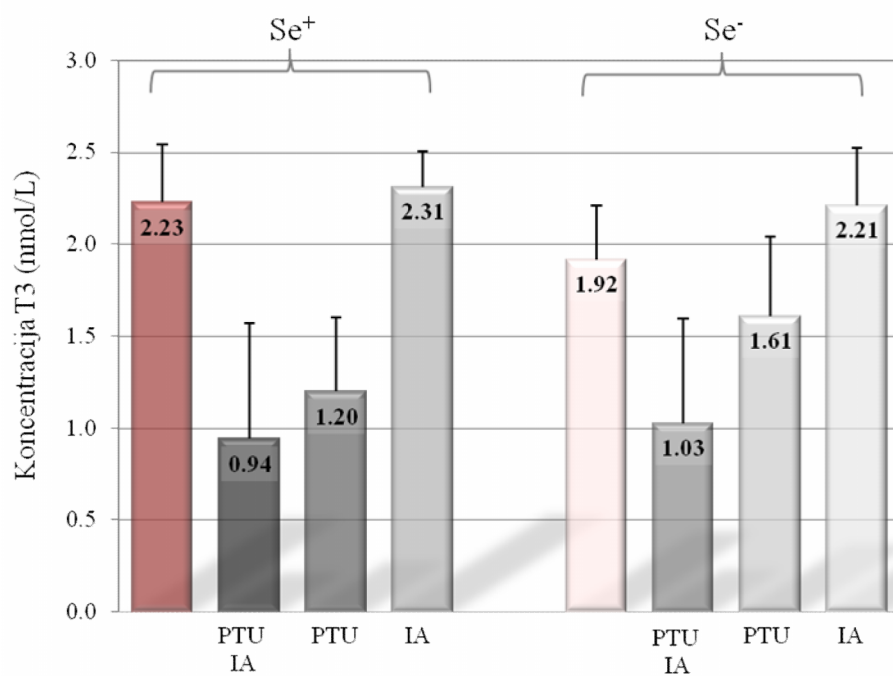
Tabela 5.3.1. Koncentracija trijodtironina (T3) u krvnoj plazmi pacova nakon tretmana 3 i 7 nedelja (nmol/L).

Grupa	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	
<u>3 nedelje</u>							
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	7	2,23	0,318	0,120	14,288	1,71-2,61
	PTU ⁺ IA ⁺	7	0,94	0,630	0,238	66,930	0,15-1,61
	PTU ⁺ IA ⁻	8	1,20	0,405	0,143	33,727	0,62-1,57
	PTU ⁻ IA ⁺	7	2,31	0,190	0,072	8,204	2,02-2,57
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	7	1,92	0,291	0,110	15,152	1,53-2,29
	PTU ⁺ IA ⁺	8	1,03	0,573	0,202	55,825	0,35-1,77
	PTU ⁺ IA ⁻	7	1,61	0,431	0,163	26,743	0,78-2,07
	PTU ⁻ IA ⁺	6	2,21	0,315	0,129	14,275	1,81-2,73
<u>7 nedelja</u>							
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	8	1,74	0,173	0,061	9,946	1,33-1,90
	PTU ⁺ IA ⁺	8	1,92	0,127	0,045	6,607	1,79-2,10
	PTU ⁺ IA ⁻	8	1,91	0,195	0,069	10,194	1,61-2,12
	PTU ⁻ IA ⁺	8	1,73	0,218	0,080	12,202	1,45-2,02
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	8	2,07	0,246	0,087	11,873	1,70-2,53
	PTU ⁺ IA ⁺	8	1,66	0,445	0,168	26,891	1,05-2,35
	PTU ⁺ IA ⁻	8	1,12	0,540	0,191	48,127	0,21-1,63
	PTU ⁻ IA ⁺	8	2,16	0,273	0,096	12,612	1,64-2,51

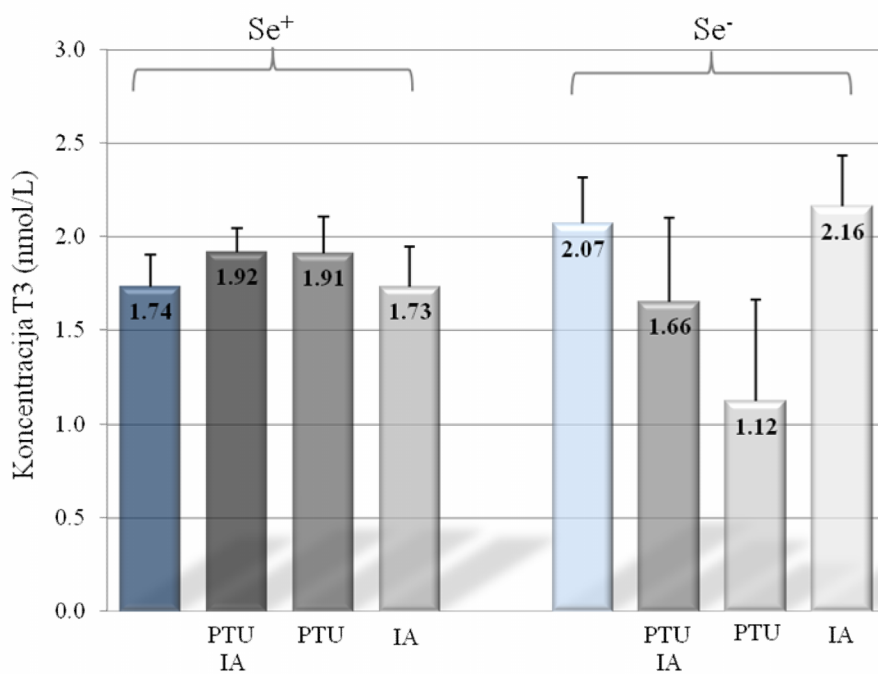
Najniža prose na vrednost T3 nakon tri nedelje tretmana je zabeležena u oglednoj grupi 2 (Se⁺PTU⁺IA⁺) i iznosila je 0,94±0,63 nmol/L, a najviša u oglednoj grupi 4 (Se⁺PTU⁻IA⁺), 2,31±0,19 nmol/L. Niže vrednosti su bile izražene kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki tretiranih propiltiouracilom (Grafikon 5.3.1.).

Nakon sedam nedelja tretmana došlo je do izjednačavanja koncentracije T3 kod selenadekvatnih jedinki i vrednosti su se kretale od 1,73±0,22 nmol/L (ogledna grupa 4) do 1,92±0,13 nmol/L (ogledna grupa 2) (Grafikon 5.3.2.). Najniža vrednost ovog

parametra je zabeležena u selendeficitnoj grupi tretiranoj propiltiouracilom (ogledna grupa 7).



Grafikon 5.3.1. Koncentracija trijodtironina (T3) u krvnoj plazmi oglednih pacova nakon 3 nedelje tretmana (nmol/L).



Grafikon 5.3.2. Koncentracija trijodtironina (T3) u krvnoj plazmi oglednih pacova nakon 7 nedelja tretmana (nmol/L).

Metodom dvofaktorske analize varijanse, uticaj seleno je da je tretman sa blokatorima uticao na vrednosti T3 u krvi i nakon tri i nakon sedam nedelja tretmana. Nakon sedam nedelja tretmana, interakcija između seleno i blokatora dejodinaza je tako uticala na vrednosti T3 (Tabela 5.3.2.).

Tabela 5.3.2. F vrednosti i značajnost uticaja seleno i blokatora dejodinaza na koncentraciju T3 u krvnoj plazmi pacova (dvofaktorska analiza varijanse- *two-way ANOVA*).

	<u>3 nedelje</u>	<u>7 nedelja</u>
Blokatori	27,74 (p<0,001)	6,339 (p<0,001)
Status seleno	0,034 (p>0,05)	0,898 (p>0,05)
Blokatori x Se	1,843 (p>0,05)	13,68 (p<0,001)

Selenadekvatne i selendeficitne ogledne životinje tretirane propiltiouracilom sa ili bez jodopone kiseline su nakon tri nedelje imale statistiki značajno niže vrednosti T3 (Tabela 5.3.3.). Nakon 7 nedelja tretmana, nisu postojale statistiki značajne razlike između koncentracija T3 selenadekvatnih jedinki. Selendeficitna grupa tretirana sa PTU je imala statistiki značajno nižu koncentraciju T3 u krvi u odnosu na kontrolnu grupu kao i u odnosu na selendeficitnu grupu netretiranu sa blokatorima (Se⁻PTU⁺IA⁻).

Tabela 5.3.3. Značajnost razlika u vrednostima koncentracija trijodtironina (T3) u krvnoj plazmi pacova nakon tretmana 3 i 7 nedelja, Studentov t-test (nsz-nije statisti ki značajno, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

		Se+				Se-			
		PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
Se+	PTU ⁻ IA ⁻		***	***	nsz	nsz	***	*	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺			nsz	***	**	nsz	*	**
	PTU ⁺ IA ⁻				***	**	nsz	nsz	***
	PTU ⁻ IA ⁺					*	***	**	nsz
Se-	PTU ⁻ IA ⁻						**	nsz	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺							*	***
	PTU ⁺ IA ⁻								*
	PTU ⁻ IA ⁺								

		Se+				Se-			
		PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
Se+	PTU ⁻ IA ⁻		nsz	nsz	nsz	**	nsz	*	**
	PTU ⁺ IA ⁺			nsz	nsz	nsz	nsz	**	*
	PTU ⁺ IA ⁻				nsz	nsz	nsz	**	nsz
	PTU ⁻ IA ⁺					*	nsz	*	**
Se-	PTU ⁻ IA ⁻						nsz	**	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺							nsz	*
	PTU ⁺ IA ⁻								***
	PTU ⁻ IA ⁺								

Značajnost razlika u koncentracijama T3 u krvnoj plazmi pacova između u jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja prikazana je u tabeli 5.3.4. Kod selenadekvatnih jedinki tretiranih sa PTU (ogledne grupe 2 i 3), došlo je do statisti ki značajnog povećanja koncentracije T3 u krvi u periodu od treće do sedme nedelje tretmana. Kod selendeficitnih jedinki tretiranih i sa PTU i sa jopanoi nom kiselinom, došlo je do statisti ki značajnog porasta koncentracije T3, dok je tretman samo sa PTU doveo do pada koncentracije T3 u krvi.

Tabela 5.3.4. Značajnost razlika u koncentracijama trijodtironina (T3) u krvnoj plazmi pacova između u jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja, Studentov t-test

Se+				Se-			
PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	nsz	p<0,05	p<0,05	nsz

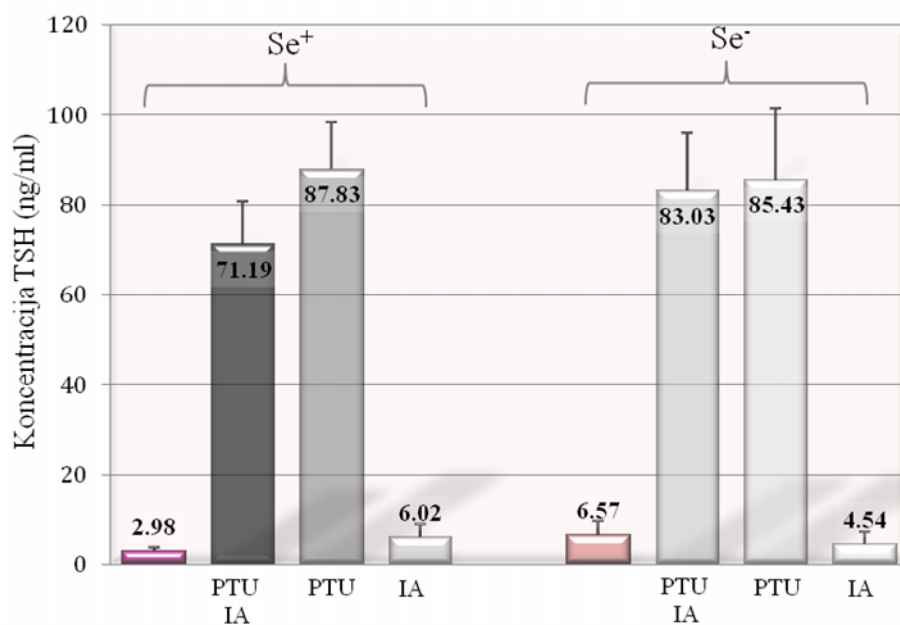
5.4. Koncentracija tireostimuliraju eg hormona (TSH)

Nivo tireostimuliraju eg hormona (TSH) u krvnoj plazmi oglednih životinja, nakon tri nedelje tretmana, bio je najniži u kontrolnoj grupi (Se⁺PTU⁻IA⁻) i iznosio je 2,947±0,825 ng/mL (Tabela 5.4.1., Grafikon 5.4.1.). Ogledne grupe tretirane propiltiouracilom su imale nekoliko puta ve u koncentraciju TSH, i to 71,186±9,275 ng/mL grupa tretirana sa PTU i jopanoi nom kiselinom (Se⁺PTU⁺IA⁺), odnosno 87,827±10,339 ng/mL grupa tretirana samo sa PTU (Se⁺PTU⁺IA⁻).

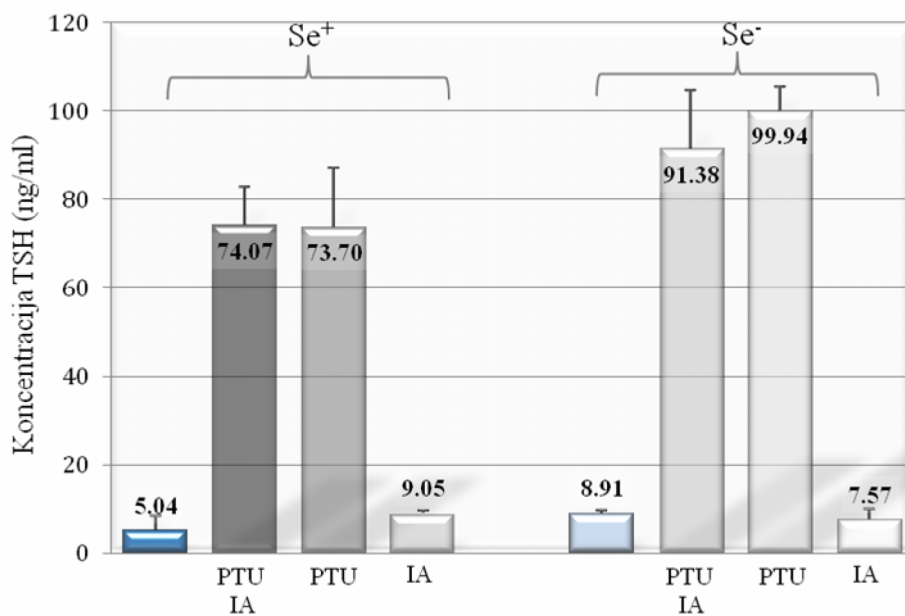
Tabela 5.4.1. Koncentracija tireostimuliraju eg hormona (TSH) u krvnoj plazmi pacova nakon tretmana 3 i 7 nedelja (ng/mL).

Grupa	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	
<u>3 nedelje</u>							
Se ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	5	2,98	0,825	0,369	27,750	2,45-4,17
	PTU ⁺ IA ⁺	5	71,19	9,275	4,148	13,029	60,43-86,02
	PTU ⁺ IA ⁻	6	87,83	10,339	4,221	11,772	74,57-100,61
	PTU ⁻ IA ⁺	6	6,02	2,779	1,134	46,185	2,84-9,29
Se ⁻	PTU ⁻ IA ⁻	6	6,57	3,026	1,236	46,077	2,15-9,02
	PTU ⁺ IA ⁺	6	83,03	12,707	5,188	15,305	63,80-96,94
	PTU ⁺ IA ⁻	6	85,43	15,639	6,385	18,306	60,72-108,16
	PTU ⁻ IA ⁺	6	4,54	2,630	1,074	57,930	2,35-8,87
<u>7 nedelja</u>							
Se ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	6	5,04	3,276	1,337	64,976	1,14-9,45
	PTU ⁺ IA ⁺	6	74,07	8,471	3,458	11,436	61,56-84,35
	PTU ⁺ IA ⁻	5	73,70	13,203	5,905	17,915	50,81-83,05
	PTU ⁻ IA ⁺	5	9,05	0,442	0,198	4,879	8,64-9,68
Se ⁻	PTU ⁻ IA ⁻	5	8,91	0,635	0,284	7,126	8,01-9,67
	PTU ⁺ IA ⁺	5	91,38	13,049	5,836	14,280	75,45-106,28
	PTU ⁺ IA ⁻	5	99,94	5,359	2,397	5,362	93,03-107,53
	PTU ⁻ IA ⁺	4	7,57	2,234	1,117	29,506	4,30-9,34

Kod jedinki koje su u eksperimentu bile sedam nedelja (Tabela 5.4.1., Grafikon 5.4.2.), najniža srednja vrednost TSH je tako e zabeležena kod kontrolne grupe (5,04±3,28 ng/mL), a najviša kod selendeficitnih jedinki tretiranih sa PTU (99,94±5,36 ng/mL).



Grafikon 5.4.1. Koncentracija TSH u krvnoj plazmi pacova nakon 3 nedelje ogleda, (ng/mL).



Grafikon 5.4.2. Koncentracija TSH u krvnoj plazmi pacova nakon 7 nedelja ogleda, (ng/mL).

Analiziraju i uticaj selena i blokatora na koncentraciju TSH u krvi metodom dvofaktorske analize varijanse, uo en je veliki uticaj blokatora nakon tri nedelje tretmana ($p < 0,001$), a nakon sedam nedelja, na nivo TSH u krvi su uticali i blokatori i status selena samostalno i u interakciji (Tabela 5.4.2.).

Tabela 5.4.2. F vrednosti i zna ajnost uticaja selena i blokatora dejodinaza na koncentraciju TSH u krvnoj plazmi pacova, (dvofaktorska analiza varijanse- *two-way ANOVA*).

	<u>3 nedelje</u>	<u>7 nedelja</u>
Blokatori	284,2 ($p < 0,001$)	344,4 ($p < 0,001$)
Status selena	1,197 ($p > 0,05$)	22,87 ($p < 0,001$)
Blokatori x Se	1,525 ($p > 0,05$)	6,903 ($p < 0,001$)

Ogledne grupe koje su dobijale propiltiouracil (2, 3, 6 i 7) su imale statisti ki zna ajno viši nivo TSH u krvi od kontrolne grupe i nakon tri nedelje i nakon sedam nedelja tretmana (Tabela 5.4.3.). Selendeficitne jedinke su imale viši nivo TSH u odnosu na kontrolnu selenadekvatnu grupu i nakon tri i nakon sedam nedelja tretmana.

Tabela 5.4.3. Značajnost razlika u vrednostima koncentracija tireostimulirajućeg hormona (TSH) u krvnoj plazmi pacova nakon tretmana 3 i 7 nedelja, Studentov t-test (nsz-nije statistički značajno, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

		3 nedelje							
		Se+				Se-			
		PTU⁻ IA⁻	PTU⁺ IA⁺	PTU⁺ IA⁻	PTU⁻ IA⁺	PTU⁻ IA⁻	PTU⁺ IA⁺	PTU⁺ IA⁻	PTU⁻ IA⁺
Se+	PTU⁻ IA⁻		***	***	*	*	***	***	nsz
	PTU⁺ IA⁺			*	***	***	nsz	nsz	***
	PTU⁺ IA⁻				***	***	nsz	nsz	***
	PTU⁻ IA⁺					nsz	***	***	nsz
Se-	PTU⁻ IA⁻						***	***	nsz
	PTU⁺ IA⁺							nsz	***
	PTU⁺ IA⁻								***
	PTU⁻ IA⁺								
		7 nedelja							
		Se+				Se-			
		PTU⁻ IA⁻	PTU⁺ IA⁺	PTU⁺ IA⁻	PTU⁻ IA⁺	PTU⁻ IA⁻	PTU⁺ IA⁺	PTU⁺ IA⁻	PTU⁻ IA⁺
Se+	PTU⁻ IA⁻		***	***	*	*	***	***	nsz
	PTU⁺ IA⁺			nsz	***	***	*	***	***
	PTU⁺ IA⁻				***	***	nsz	**	***
	PTU⁻ IA⁺					nsz	***	***	nsz
Se-	PTU⁻ IA⁻						***	***	nsz
	PTU⁺ IA⁺							nsz	***
	PTU⁺ IA⁻								***
	PTU⁻ IA⁺								

U tabeli 5.4.4. su prikazane statističke značajnosti razlika koncentracija TSH između u ogleđnih grupa nakon 3 i 7 nedelja tretmana. Nivo hormona je u gotovo svim grupama bio viši nakon tretmana od 7 nedelja. Međutim, kod kontrolne grupe (Se⁺PTU⁻IA⁻) i selenadekvatne grupe tretirane sa oba blokatora istovremeno (Se⁺PTU⁺IA⁺), kao i kod selendeficitnih grupa 5 i 6, ovo povećanje nije bilo statistički značajno.

Tabela 5.4.4. Značajnost razlika u koncentracijama tireostimulirajućeg hormona (TSH) u krvnoj plazmi pacova između u jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja, Studentov t-test.

Se+				Se-			
PTU⁻ IA⁻	PTU⁺ IA⁺	PTU⁺ IA⁻	PTU⁻ IA⁺	PTU⁻ IA⁻	PTU⁺ IA⁺	PTU⁺ IA⁻	PTU⁻ IA⁺
nsz	nsz	p<0,05	p<0,05	nsz	nsz	p<0,05	p<0,05

5.5. Procentualni odnos T3/T4 (procenat konverzije T4 u T3)

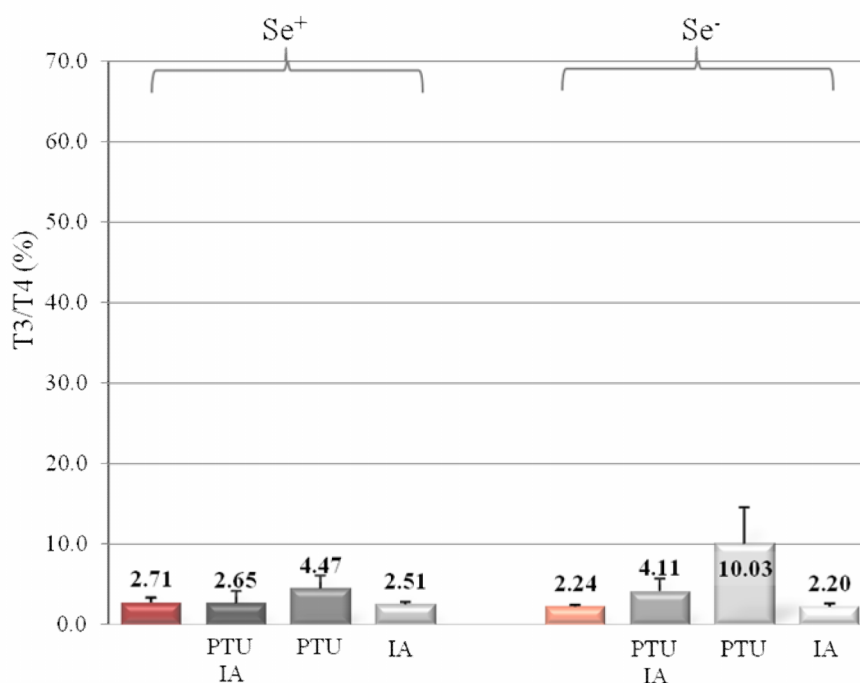
Najniža procentualna zastupljenost T3 u odnosu na T4 tre e nedelje ogleda je zabeležena u oglednoj grupi 8 (Se⁻PTU⁻IA⁺) i iznosila je 2,20%. Najviša vrednost je zabeležena u oglednoj grupi 7 (Se⁻PTU⁺IA⁻), a bila je 10,03%. Najviši procenat konverzije T4 u T3 je bio u grupama tretiranim propiltiouracilom i iznosio je 4,47% kod selenadekvatnih jedinki i 10,03% kod selendeficitnih jedinki (Tabela 5.5.1., Grafikon 5.5.1.).

Tabela 5.5.1. Konverzija tiroksina u trijodtironin (T3/T4x100) kod pacova nakon tretmana 3 i 7 nedelja (%).

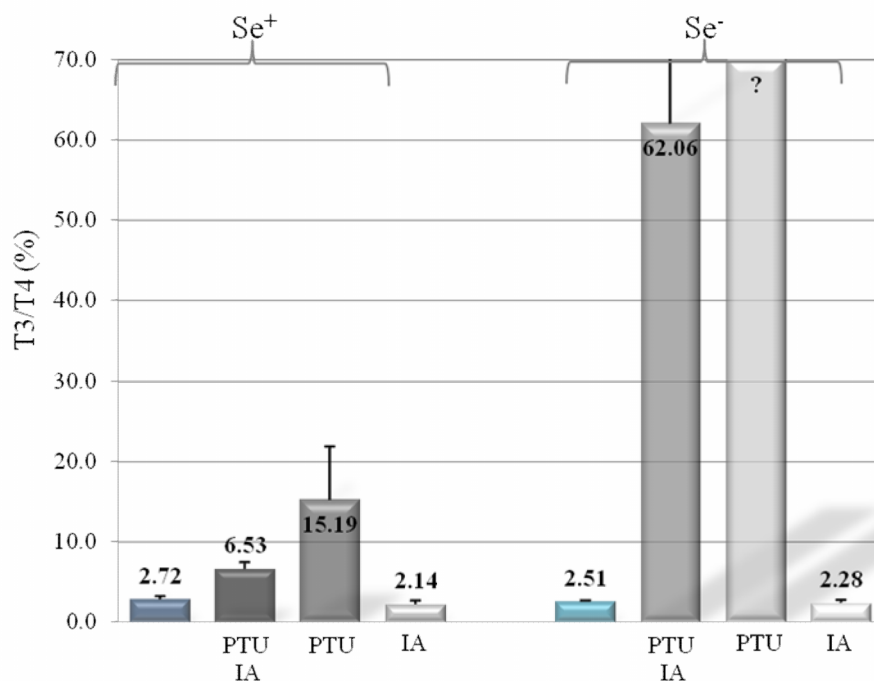
Grupa	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	
<u>3 nedelje</u>							
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	7	2,71	0,608	0,230	22,37	2,09-3,94
	PTU ⁺ IA ⁺	7	2,65	1,50	0,565	56,37	0,57-4,40
	PTU ⁺ IA ⁻	7	4,47	1,580	0,596	35,27	1,88-6,50
	PTU ⁻ IA ⁺	7	2,51	0,307	0,116	12,24	2,16-2,96
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	7	2,24	0,205	0,078	9,15	1,95-2,49
	PTU ⁺ IA ⁺	8	4,11	1,477	0,522	35,98	2,32-6,73
	PTU ⁺ IA ⁻	7	10,03	4,483	1,694	44,71	6,16-16,54
	PTU ⁻ IA ⁺	6	2,20	0,411	0,168	18,62	1,58-2,60
<u>7 nedelja</u>							
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	8	2,72	0,426	0,151	15,65	2,16-3,36
	PTU ⁺ IA ⁺	8	6,53	0,868	0,307	13,31	5,40-7,78
	PTU ⁺ IA ⁻	8	15,19	6,497	2,297	42,77	7,78-27,51
	PTU ⁻ IA ⁺	7	2,14	0,459	0,174	21,46	1,72-2,88
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	8	2,51	0,135	0,048	5,38	2,30-2,70
	PTU ⁺ IA ⁺	5	62,06	31,330	14,040	50,49	32,34-100,0
	PTU ⁺ IA ⁻	/	/	/	/	/	/
	PTU ⁻ IA ⁺	8	2,28	0,374	0,132	16,38	1,79-2,75

Nakon sedam nedelja tretmana, konverzija T4 u T3 u kontrolnoj grupi je ostala ista, a u grupama tretiranim propiltiouracilom je došlo do višestrukog pove anja procenta konverzije koji je kod ogledne grupe 2 (Se⁺PTU⁺IA⁺) iznosio 6,53% što je 2,46 puta više u odnosu na istovetno tretirane jedinke nakon 3 nedelje ogleda, a u

oglednoj grupi 3 ($\text{Se}^+\text{PTU}^+\text{IA}^-$) 15,19%, što je 3,4 puta više u odnosu na istovetno tretirane jedinke nakon 3 nedelje oglada. Kod selendeficitnih jedinki procentualno pove anje konverzije je bilo još izraženije te je u oglednoj grupi 6 ($\text{Se}^-\text{PTU}^+\text{IA}^+$) iznosilo 62,06%, što je 15,1 puta ve a konverzija u odnosu na konverziju kod istovetno tretiranih jedinki nakon 3 nedelje oglada. Zbog niskih vrednosti tiroksina kod jedinki ogledne grupe 7 ($\text{Se}^-\text{PTU}^+\text{IA}^-$), nije bilo mogu e utvrditi ta an procenat konverzije T4 u T3, ali se, sude i po vrednostima T3, približio vrednosti od 100% (Tabela 5.5.1., Grafikon 5.5.2.).



Grafikon 5.5.1. Procenat konverzije T4 u T3 nakon 3 nedelje tretmana.



Grafikon 5.5.2. Procenat konverzije T4 u T3 nakon 7 nedelja tretmana.

Nakon tri i nakon sedam nedelja, status selena i primena blokatora su zna ajno uticali na procenat konverzije tiroksina u trijodtironin (Tabela 5.5.2.), a što je pokazala analiza varijanse.

Tabela 5.3.2. F vrednosti i zna ajnost uticaja selena i blokatora dejodinaza na procenat konverzije T4 u T3, (dvofaktorska analiza varijanse- *two-way ANOVA*).

	<u>3 nedelje</u>	<u>7 nedelja</u>
Blokatori	21,07 (p<0,001)	32,12 (p<0,001)
Status selena	9,672 (p<0,01)	54,93 (p<0,001)
Blokatori x Se	7,825 (p<0,001)	18,37 (p<0,001)

Nakon tri nedelje eksperimenta, statisti ki zna ajno ve i procenat konverzije izra unat je u selenadekvatnim i selendeficitnim grupama tretiranim sa PTU. Oglodna grupa 6, koja je dobijala PTU i jopanoi nu kiselinu zajedno, imala je pove an procenat konverzije T4 u T3, ali ovo pove anje nije bilo statisti ki zna ajno. Nakon sedam

nedelja tretmana, statistički značajno povećanje procenta konverzije T4 u T3 je zabeleženo kod selendeficitnih jedinki kojima je aplikovana jopanoi na kiselinu i PTU i to na nivou $p < 0,001$. Selendeficitne jedinke tretirane PTU su imale visok nivo konverzije, ali taj procenat kao i statističku značajnost nije bilo moguće odrediti zbog izrazito niskih vrednosti tiroksina u krvnoj plazmi oglednih životinja (Tabela 5.5.3.).

Tabela 5.5.3. Značajnost razlika u konverziji T4 u T3 kod pacova nakon tretmana 3 i 7 nedelja, Studentov t-test (nsz-nije statistički značajno, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

		3 nedelje							
		Se+				Se-			
		PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
Se+	PTU ⁻ IA ⁻		nsz	*	nsz	nsz	*	**	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺			*	nsz	nsz	nsz	**	nsz
	PTU ⁻ IA ⁺				*	**	nsz	*	**
	PTU ⁺ IA ⁻					nsz	*	**	nsz
Se-	PTU ⁻ IA ⁻					*	**	nsz	
	PTU ⁺ IA ⁺						*	*	
	PTU ⁺ IA ⁻							**	
	PTU ⁻ IA ⁺								**
		7 nedelja							
		Se+				Se-			
		PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
Se+	PTU ⁻ IA ⁻		***	***	*	nsz	*	/	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺			**	***	***	*	/	***
	PTU ⁻ IA ⁺				***	***	*	/	***
	PTU ⁺ IA ⁻					nsz	*	/	nsz
Se-	PTU ⁻ IA ⁻					*	/	nsz	
	PTU ⁺ IA ⁺						/	*	
	PTU ⁺ IA ⁻							/	
	PTU ⁻ IA ⁺								/

Status selena i primena jopanoi ne kiseline nije dovela do promene konverzije T4 u T3 u periodu između treće i sedme nedelje tretmana, ali je primena PTU izazvala značajno povećanje stepena konverzije T4 u T3 (Tabela 5.5.4.).

Tabela 5.5.4. Značajnost razlika u konverziji T4 u T3 između u jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja, Studentov t-test.

Se+				Se-			
PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
nsz	p<0,001	p<0,01	nsz	p<0,05	p<0,05	p<0,001(?)	nsz

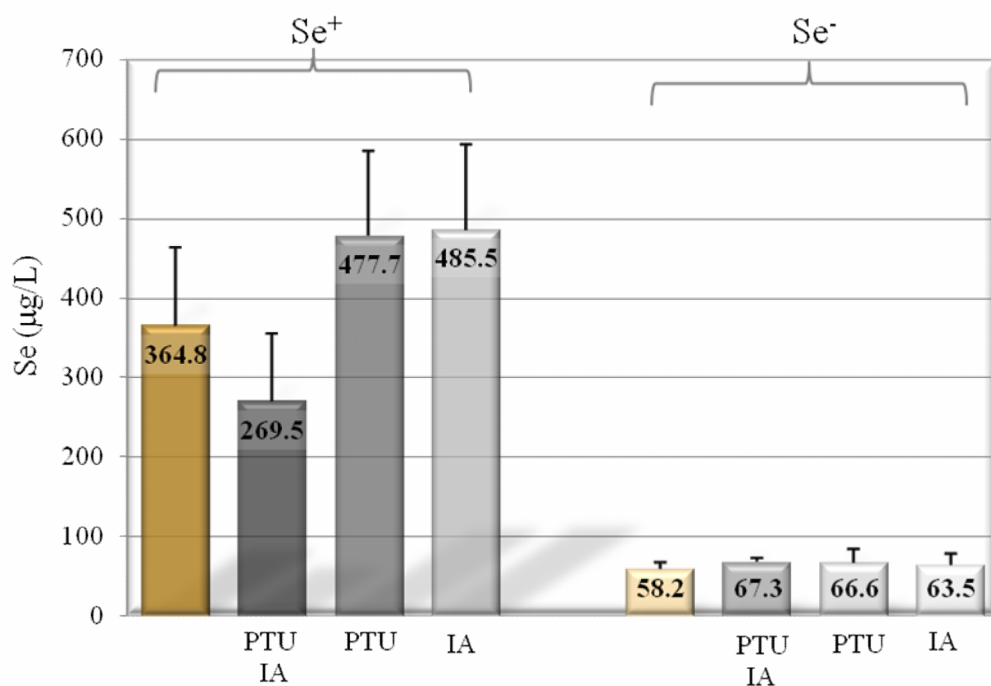
5.6. Koncentracija selena u punoj krvi

Prose na koncentracija selena u punoj krvi eksperimentalnih životinja nakon tri nedelje tretmana je bila najniža u grupi sa selendeficitnom ishranom (Se⁻PTU⁻IA⁻) i iznosila je 58,17±8,26 µg/L. Najviša prose na vrednost ovog parametra bila je zabeležena kod selenadekvatnih jedinki koje su dobijale jopanoičnu kiselinu i iznosila je 485,5±105,8 µg/L (Grafikon 5.6.1., Tabela 5.6.1.).

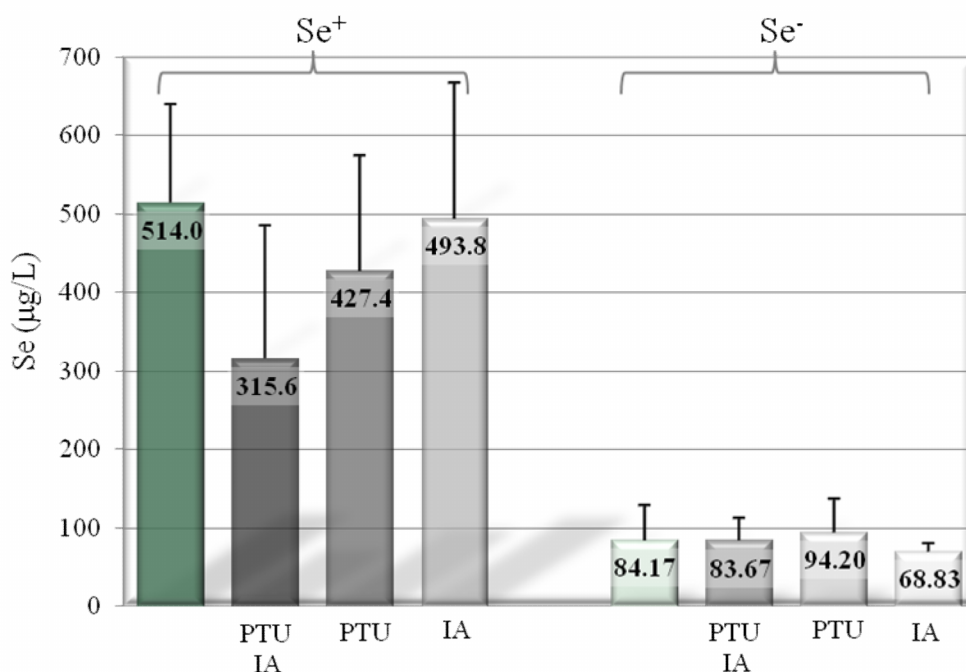
Tabela 5.6.1. Koncentracija selena u krvi pacova tokom ogleda, (µg/L).

Grupa	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	
<u>3 nedelje</u>							
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	5	364,8	98,06	43,85	26,88	280,0-526,0
	PTU ⁺ IA ⁺	6	269,5	85,10	34,74	31,58	123,0-363,0
	PTU ⁺ IA ⁻	6	477,7	105,41	43,03	22,06	291,0-586,0
	PTU ⁻ IA ⁺	6	485,5	105,79	39,98	21,79	287,0-630,0
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	6	58,17	8,26	3,37	14,19	47,0-70,0
	PTU ⁺ IA ⁺	4	67,25	4,50	2,25	6,69	62,0-71,0
	PTU ⁺ IA ⁻	5	66,60	16,62	7,43	24,96	51,0-90,0
	PTU ⁻ IA ⁺	8	63,50	13,88	4,91	21,85	41,0-86,0
<u>7 nedelja</u>							
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	7	514,0	125,1	47,27	24,33	308,0-665,0
	PTU ⁺ IA ⁺	5	315,6	168,6	75,40	53,43	189,0-566,0
	PTU ⁺ IA ⁻	5	427,4	145,7	65,15	34,08	331,0-682,0
	PTU ⁻ IA ⁺	6	493,8	171,5	70,03	34,74	287,0-785,0
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	6	84,17	44,43	18,14	52,79	53,0-171,0
	PTU ⁺ IA ⁺	6	83,67	28,20	11,51	33,71	50,0-112,0
	PTU ⁺ IA ⁻	5	94,20	41,54	18,58	44,10	73,0-164,0
	PTU ⁻ IA ⁺	6	68,83	10,76	4,39	15,63	47,0-75,0

Nakon sedam nedelja tretmana, prose na koncentracija selena je bila najviša u kontrolnoj grupi ($\text{Se}^+\text{PTU}^-\text{IA}^-$) i iznosila je $514,0 \pm 125,1 \mu\text{g/L}$, a najniža u selendeficitnoj grupi tretiranoj sa jopanoi nom kiselinom ($\text{Se}^-\text{PTU}^-\text{IA}^+$) i iznosila je $68,83 \pm 10,76 \mu\text{g/L}$, (Grafikon 5.6.2.).



Grafikon 5.6.1. Koncentracija selena u punoj krvi pacova nakon 3 nedelje ogleda ($\mu\text{g/L}$).



Grafikon 5.6.2. Koncentracija selena u punoj krvi pacova nakon 7 nedelja ogleda ($\mu\text{g/L}$).

Nakon tri nedelje tretmana, upotreba blokatora, kao i koli ina selena u ishrani su imali zna ajan uticaj na koncentraciju selena u krvi ispitivanih jedinki (Tabela 5.6.2.). Nakon sedam nedelja tretmana na ovaj parametar je uticao samo nivo selena u hrani.

Tabela 5.6.2. F vrednosti i zna ajnost uticaja selena i blokatora dejodinaza na koncentraciju selena u krvi pacova, (dvofaktorska analiza varijanse-*two-way ANOVA*).

	<u>3 nedelje</u>	<u>7 nedelja</u>
Blokatori	9,301 ($p < 0,001$)	1,755 ($p > 0,05$)
Status selena	315,0 ($p < 0,001$)	117,9 ($p < 0,001$)
Blokatori x Se	9,282 ($p < 0,001$)	2,037 ($p > 0,05$)

Iako su razlike u koncentraciji selena u krvi selenadekvatnih jedinki bile o igledne, t-test nije pokazao statisti ke zna ajnosti izme u ovih grupa nakon tri nedelje tretmana. Selendeficitne grupe su u ovom periodu imale statisti ki zna ajno niže koncentracije selena u odnosu na kontrolnu grupu i to na nivou zna ajnosti $p < 0,001$ (Tabela 5.6.3.).

Nakon sedam nedelja tretmana izme u koncentracija selena u krvi selenadekvatnih jedinki nisu postojale statisti ki zna ajne razlike, iako je grupa tretirana sa oba blokatora imala izrazito nižu koncentraciju. Selendeficitne jedinke su u istom periodu imale statisti ki zna ajno nižu koncentraciju selena u krvi u odnosu na kontrolnu grupu.

Tabela 5.6.3. Zna ajnost razlika u koncentraciji selena kod jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja, Studentov t-test (nsz-nije statisti ki zna ajno, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

		3 nedelje							
		Se+				Se-			
		PTU⁻ IA⁻	PTU⁺ IA⁺	PTU⁺ IA⁻	PTU⁻ IA⁺	PTU⁻ IA⁻	PTU⁺ IA⁺	PTU⁺ IA⁻	PTU⁻ IA⁺
Se+	PTU⁻ IA⁻		nsz	nsz	nsz	**	**	**	**
	PTU⁺ IA⁺			**	**	**	**	**	**
	PTU⁺ IA⁻				nsz	***	***	***	***
	PTU⁻ IA⁺					***	***	***	***
Se-	PTU⁻ IA⁻						nsz	nsz	nsz
	PTU⁺ IA⁺							nsz	nsz
	PTU⁺ IA⁻								nsz
	PTU⁻ IA⁺								
		7 nedelja							
		Se+				Se-			
		PTU⁻ IA⁻	PTU⁺ IA⁺	PTU⁺ IA⁻	PTU⁻ IA⁺	PTU⁻ IA⁻	PTU⁺ IA⁺	PTU⁺ IA⁻	PTU⁻ IA⁺
Se+	PTU⁻ IA⁻		nsz	nsz	nsz	***	***	***	***
	PTU⁺ IA⁺			nsz	nsz	*	*	*	*
	PTU⁺ IA⁻				nsz	**	**	**	**
	PTU⁻ IA⁺					**	**	**	**
Se-	PTU⁻ IA⁻						nsz	nsz	nsz
	PTU⁺ IA⁺							nsz	nsz
	PTU⁺ IA⁻								nsz
	PTU⁻ IA⁺								

Prilikom posmatranja razlika izme u jedinki tretiranih 3 nedelje i 7 nedelja, do statisti ki zna ajnog pove anja koncentracije selena u krvi je došlo samo u kontrolnoj grupi pri emu kod ostalih grupa nisu utvr ene statisti ki zna ajne razlike (Tabela 5.6.4.).

Tabela 5.6.4. Značajnost razlika u koncentraciji selena između u jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja, Studentov t-test.

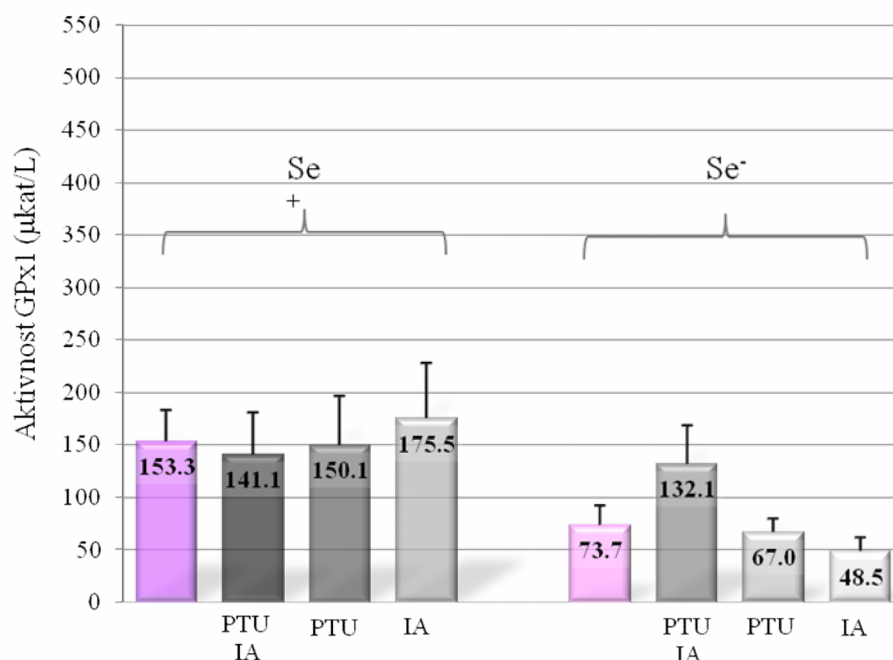
Se+				Se-			
PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
p<0,05	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz	nsz

5.7. Aktivnost citosolne glutation peroksidaze (GPx1)

Srednje vrednosti aktivnosti GPx1 posle tri nedelje tretmana su se kretale od 48,50±12,68 µkat/L (Se⁻PTU⁻IA⁺) do 175,5±51,73 µkat/L u grupi selenadekvatnih jedinki tretiranih jopanoi nom kiselinom (Se⁺PTU⁻IA⁺). Jedinke iz grupa hranjenih selendeficitnom hranom (5, 6, 7 i 8) su imale manju aktivnost ovog enzima (Tabela 5.7.1., Grafikon 5.7.1.).

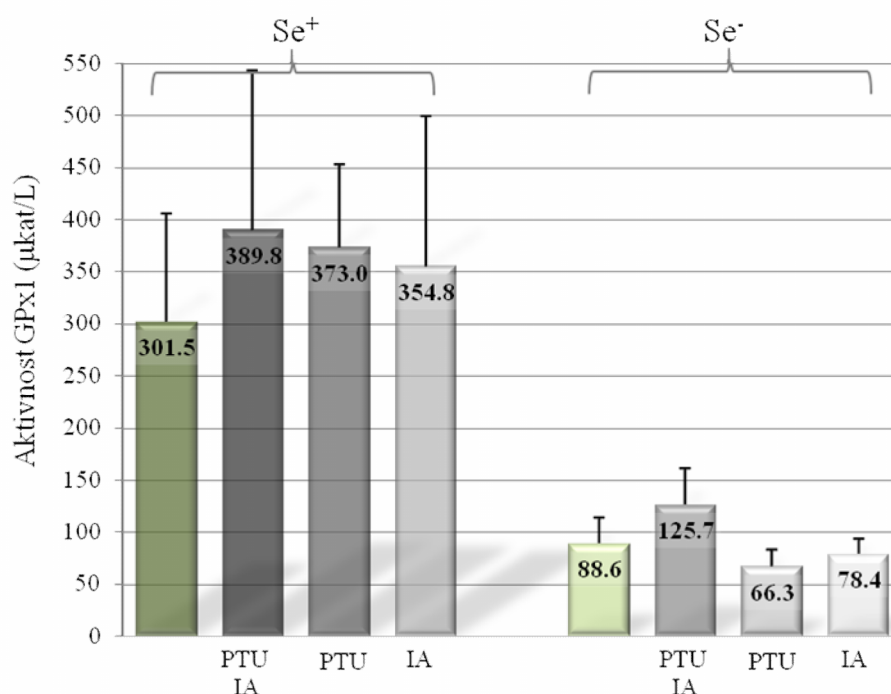
Tabela 5.7.1. Aktivnost citosolne glutation peroksidaze (GPx1) pacova, (µkat/L).

Grupa	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	
<u>3 nedelje</u>							
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	8	153,3	28,55	12,77	18,62	114,2-186,3
	PTU ⁺ IA ⁺	4	141,1	39,53	16,14	28,02	71,5-176,9
	PTU ⁺ IA ⁻	5	150,1	46,09	18,82	30,71	71,15-197,4
	PTU ⁻ IA ⁺	4	175,5	51,73	19,55	29,48	76,21-238,0
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	6	73,7	17,67	7,23	24,00	57,46-101,4
	PTU ⁺ IA ⁺	4	132,1	35,91	13,57	27,18	73,15-180,9
	PTU ⁺ IA ⁻	5	67,0	12,62	5,64	18,82	46,11-78,91
	PTU ⁻ IA ⁺	7	48,5	12,68	4,48	26,15	16,92-64,05
<u>7 nedelja</u>							
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	5	301,5	103,31	36,52	34,27	152,4-469,3
	PTU ⁺ IA ⁺	6	389,8	152,78	76,39	39,20	248,3-581,1
	PTU ⁺ IA ⁻	6	373,0	78,55	35,13	21,06	297,6-505,2
	PTU ⁻ IA ⁺	7	354,8	144,05	72,02	40,61	184,2-529,2
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	6	88,6	23,89	9,76	26,96	55,35-115,4
	PTU ⁺ IA ⁺	7	125,7	34,46	17,23	27,41	96,38-175,5
	PTU ⁺ IA ⁻	5	66,3	15,50	6,93	23,38	45,98-89,31
	PTU ⁻ IA ⁺	8	78,4	14,18	5,36	18,09	58,00-94,23



Grafikon 5.7.1. Aktivnost glutation peroksidaze 1 (GPx1) u krvnoj plazmi pacova nakon 3 nedelje ogleda ($\mu\text{g/L}$).

Nakon sedam nedelja tretmana, aktivnost GPx1 se kretala od $301,5 \pm 103,3$ $\mu\text{kat/L}$ u kontrolnoj grupi do $389,8 \pm 152,8$ $\mu\text{kat/L}$ u selenadekvatnoj grupi tretiranoj propiltiouracilom i jopanoi nom kiselinom ($\text{Se}^+\text{PTU}^+\text{IA}^+$) (Grafikon 5.7.1.). Kod selendeficitnih jedinki nije došlo do zna ajnog pove anja aktivnosti ovog enzima u odnosu na životinje tretirane 3 nedelje i ona je iznosila od $66,3 \pm 15,5$ $\mu\text{kat/L}$ kod ogleadne grupe 7 ($\text{Se}^-\text{PTU}^+\text{IA}^-$) do $125,7 \pm 34,5$ $\mu\text{kat/L}$ kod ogleadne grupe 6 ($\text{Se}^-\text{PTU}^+\text{IA}^+$). Selendeficitna ogleadna grupa tretirana sa oba blokatora ($\text{Se}^-\text{PTU}^+\text{IA}^+$) je i nakon tri i nakon sedam nedelja tretmana imala višu aktivnost ovog enzima u odnosu na selendeficitne jedinice netretirane blokatorima.



Grafikon 5.7.2. Aktivnost glutation peroksidaze 1 (GPx1) u krvnoj plazmi pacova nakon 7 nedelja ogleda ($\mu\text{g/L}$).

Posle tri nedelje tretmana, na aktivnost GPx1 su uticali koli ina selena u hrani (Tabela 5.7.2.) samostalno ili u interakciji sa blokatorima. Nakon sedam nedelja tretmana, aktivnost GPx1 je zavisila isklju ivo od koli ine selena u hrani.

Tabela 5.7.2. F vrednosti i zna ajnost uticaja selena i blokatora dejodinaza na aktivnost GPx1 u krvnoj plazmi pacova, (dvo faktorska analiza varijanse- *two-way ANOVA*).

	<u>3 nedelje</u>	<u>7 nedelja</u>
Blokatori	1,704 ($p > 0,05$)	1,065 ($p > 0,05$)
Status selena	58,05 ($p < 0,001$)	110,1 ($p < 0,001$)
Blokatori x Se	6,199 ($p < 0,01$)	1,065 ($p > 0,05$)

Zna ajnosti razlika u aktivnosti citosolne glutation peroksidaze eritrocita su prikazane u tabeli 5.7.3. Nakon tri nedelje od po etka ogleda nisu zabeležene statisti ki zna ajne razlike izme u jedinki koje su hranom dobijale adekvatne koli ine selena. Grupe hranjene hranom deficitnom u selenu su imale statisti ki zna ajno manju

aktivnost GPx1, osim ogleadne grupe $Se^-PTU^+IA^+$ koja je imala nižu aktivnost ovog enzima, ali ova razlika nije bila statistički značajna. U odnosu na selendeficitne jedinice ($Se^-PTU^-IA^-$), ova grupa je imala statistički značajno višu aktivnost GPx1, što je utvrđeno t-testom. Prilikom analiziranja ovog parametra sedme nedelje, uočeni su slični rezultati. Sve selendeficitne ogleadne grupe su imale statistički značajno niže aktivnosti ovog enzima ($p < 0,001$), osim selendeficitne grupe tretirane sa oba blokatora ($p < 0,01$). Tretman sa PTU i IA kod selendeficitnih jedinki je doveo do izvesnog povećanja aktivnosti GPx1, ali nije dokazana statistička značajnost u odnosu na selendeficitne jedinice netretirane blokatorima.

Tabela 5.7.3. Značajnost razlika u vrednostima aktivnosti citosolne glutation peroksidaze (GPx1), Studentov t-test (nsz-nije statistički značajno, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

		3 nedelje							
		Se+				Se-			
		PTU⁻IA⁻	PTU⁺IA⁺	PTU⁺IA⁻	PTU⁻IA⁺	PTU⁻IA⁻	PTU⁺IA⁺	PTU⁺IA⁻	PTU⁻IA⁺
Se+	PTU⁻IA⁻		nsz	nsz	nsz	**	nsz	**	**
	PTU⁺IA⁺			nsz	nsz	**	nsz	**	**
	PTU⁺IA⁻				nsz	**	nsz	**	**
	PTU⁻IA⁺					**	nsz	**	***
Se-	PTU⁻IA⁻						**	nsz	nsz
	PTU⁺IA⁺							**	***
	PTU⁺IA⁻								*
	PTU⁻IA⁺								
		7 nedelja							
		Se+				Se-			
		PTU⁻IA⁻	PTU⁺IA⁺	PTU⁺IA⁻	PTU⁻IA⁺	PTU⁻IA⁻	PTU⁺IA⁺	PTU⁺IA⁻	PTU⁻IA⁺
Se+	PTU⁻IA⁻		nsz	nsz	nsz	***	**	***	***
	PTU⁺IA⁺			nsz	nsz	*	*	*	*
	PTU⁺IA⁻				nsz	***	***	***	***
	PTU⁻IA⁺					nsz	nsz	nsz	nsz
Se-	PTU⁻IA⁻						nsz	nsz	nsz
	PTU⁺IA⁺							*	nsz
	PTU⁺IA⁻								nsz
	PTU⁻IA⁺								

Značajna razlika u aktivnosti citosolne glutation peroksidaze (GPx1) između jedinki tretiranih tri i sedam nedelja prikazana je u tabeli 5.7.4. Kod selenadekvatnih jedinki se aktivnost GPx1 nakon 7 nedelja udvostručila u odnosu na 3 nedelje tretmana. Kod selenodeficitnih jedinki ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti enzima u zavisnosti od dužine tretmana, osim kod jedinki deficitnih u selenu, a tretiranih jopanojnom kiselinom (ogledna grupa 8), kod kojih je tokom vremena došlo do povećanja aktivnosti GPx1 na nivou značajnosti $p < 0,01$.

Tabela 5.7.4. Značajna razlika u aktivnosti plazmatske glutation peroksidaze (GPx1) između jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja, Studentov t-test.

Se+				Se-			
PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	nsz	nsz	nsz	nsz	$p < 0,01$

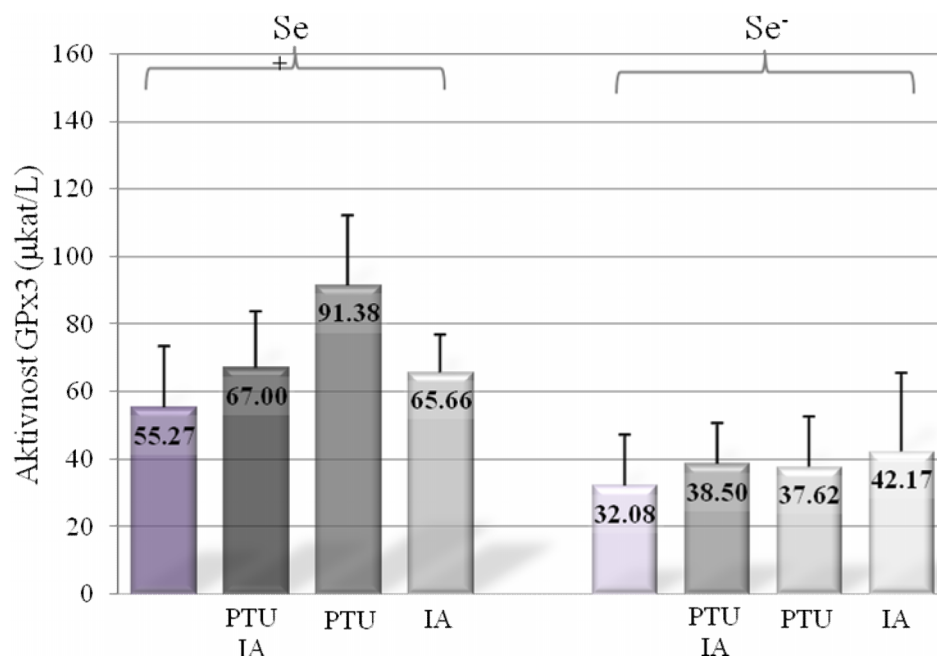
5.8. Aktivnost plazmatske glutation peroksidaze (GPx3)

Osnovni statistički parametri vezani za aktivnost glutation peroksidaze krvne plazme (GPx3) nakon tri i sedam nedelja tretmana prikazani su u tabeli 5.8.1. Najmanja srednja vrednost aktivnosti GPx3 nakon tri nedelje tretmana je zabeležena u selenodeficitnoj oglednoj grupi (Se⁻PTU⁻IA⁻) i bila je $32,08 \pm 14,87$ $\mu\text{kat/L}$. Najveća aktivnost GPx3 u tom periodu su imale selenadekvatne jedinke tretirane sa PTU (Se⁺PTU⁺IA⁻) i to u proseku $91,38 \pm 20,42$ $\mu\text{kat/L}$. Sve jedinke grupe hranjenih selenodeficitnom hranom imale su nešto niže aktivnosti GPx3 u odnosu na selenadekvatne jedinke (Grafikon 5.8.3.).

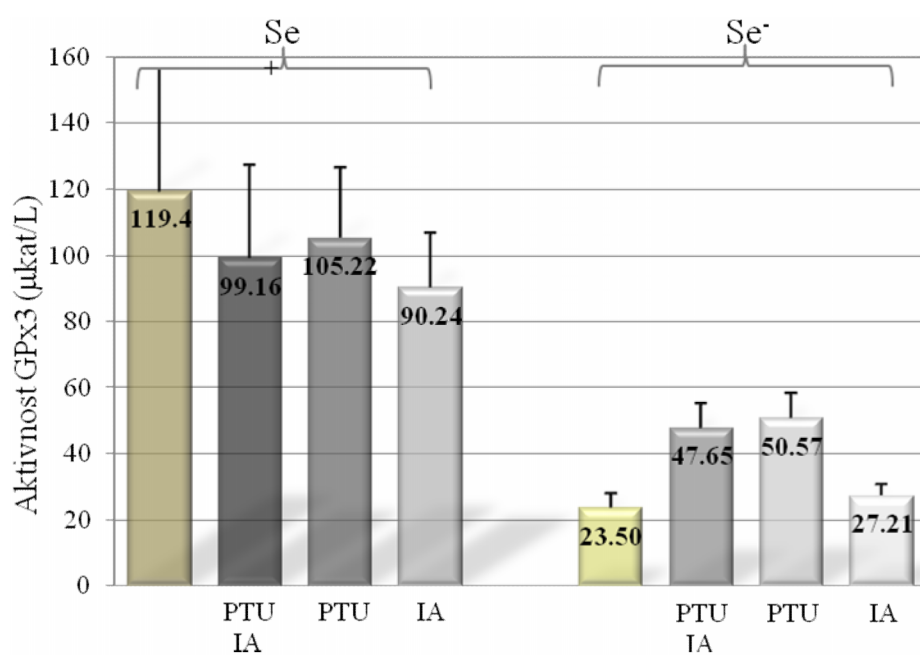
Tabela 5.8.1. Aktivnost glutation peroksidaze 3 (GPx3) u krvnoj plazmi pacova, ($\mu\text{kat/L}$).

Grupa	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	
<u>3 nedelje</u>							
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	7	55,27	17,847	6,745	32,291	27,27-73,06
	PTU ⁺ IA ⁺	7	67,00	16,561	6,259	24,716	37,71-90,91
	PTU ⁺ IA ⁻	8	91,38	20,421	7,220	22,347	64,65-125,66
	PTU ⁻ IA ⁺	7	65,66	10,952	4,140	16,682	54,88-86,20
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	7	32,08	14,873	5,622	46,363	12,79-51,52
	PTU ⁺ IA ⁺	6	38,50	11,814	4,824	30,694	29,29-59,60
	PTU ⁺ IA ⁻	7	37,62	14,809	5,597	39,369	23,57-61,28
	PTU ⁻ IA ⁺	8	42,17	23,169	8,198	55,036	20,88-82,15
<u>7 nedelja</u>							
Se+	PTU ⁻ IA ⁻	8	119,40	37,001	13,082	30,988	89,23-186,5
	PTU ⁺ IA ⁺	6	99,16	27,978	9,892	28,216	60,61-139,7
	PTU ⁺ IA ⁻	5	105,22	21,081	7,453	20,035	82,49-140,7
	PTU ⁻ IA ⁺	4	90,24	16,354	6,181	18,123	71,72-121,2
Se-	PTU ⁻ IA ⁻	6	23,48	4,318	1,527	18,388	16,16-29,63
	PTU ⁺ IA ⁺	6	47,65	7,296	2,758	15,313	38,25-56,57
	PTU ⁺ IA ⁻	5	50,57	7,353	2,600	14,540	42,76-65,32
	PTU ⁻ IA ⁺	6	27,20	3,347	1,183	12,303	22,9-31,65

Kod selenadekvatnih jedinki, nakon sedam nedelja je uo en porast aktivnosti GPx3 u odnosu na tronedeljni tretman. Najve a aktivnost je zabeležena u kontrolnoj grupi (Se⁺PTU⁻IA⁻) i bila je $119,4 \pm 37,0 \mu\text{kat/L}$, a najmanja u ogednoj grupi 5 (Se⁻PTU⁻IA⁻) - $23,48 \pm 4,32 \mu\text{kat/L}$. I nakon sedam nedelja tretmana uo ene su zna ajno niže vrednosti ovog parametra kod selendeficitnih jedinki u odnosu na selenadekvatne jedinke (Tabela 5.8.1., Grafikon 5.8.2.)



Grafikon 5.8.1. Aktivnost glutation peroksidaze 3 (GPx3) u krvnoj plazmi pacova nakon 3 nedelje ogleda (μg/L).



Grafikon 5.8.2. Aktivnost glutation peroksidaze 3 (GPx3) u krvnoj plazmi pacova nakon 7 nedelja ogleda (μg/L).

Analiziraju i uticaj selena i blokatora na aktivnost GPx3 metodom dvofaktorske analize varijanse, uo en je snažan uticaj selena ($p < 0,001$) i nešto slabiji uticaj blokatora ($p < 0,05$) nakon tri nedelje tretmana, a nakon sedam nedelja, na aktivnost GPx3 je uticala samo koli ina selena u hrani (Tabela 5.4.2.).

Tabela 5.8.2. F vrednosti i zna ajnost uticaja selena i blokatora dejodinaza na aktivnost GPx3 (dvofaktorska analiza varijanse- *two-way ANOVA*).

	<u>3 nedelje</u>	<u>7 nedelja</u>
Blokatori	3,526 ($p < 0,05$)	1,705 ($p > 0,05$)
Status selena	50,39 ($p < 0,001$)	110,9 ($p < 0,001$)
Blokatori x Se	2,569 ($p > 0,05$)	2,613 ($p > 0,05$)

Rezultati ispitivanja statisti ke zna ajnosti izme u srednjih vrednosti aktivnosti GPx3 oglednih grupa prikazane su u tabeli 5.8.3. Nakon tronedelnog tretmana, jedinke iz selenadekvatne ogledne grupe tretirane sa PTU su imale statisti ki zna ajno višu aktivnost GPx3 u odnosu na jedinke kontrolne grupe ($Se^+PTU^+IA^-$) i to na nivou zna ajnosti $p < 0,01$. Selendeficitne grupe (5, 6, 7 i 8) su imale niže srednje vrednosti aktivnosti ovog enzima u krvnoj plazmi u odnosu na kontrolnu grupu, ali ova razlika nije bila statisti ki zna ajna. Statisti ki zna ajno nižu aktivnost GPx3, nakon sedam nedelja tretmana, imale su selendeficitne jedinke (grupe 5, 6, 7 i 8) u odnosu na kontrolnu grupu. Selendeficitne grupe tretirane sa PTU su imale statisti ki zna ajno više vrednosti ovog parametra u odnosu na selendeficitne jedinke ($Se^-PTU^-IA^-$), što je pokazano t-testom.

Tabela 5.8.3. Zna ajnost razlika u vrednostima aktivnosti plazmatske glutation peroksidaze (GPx3), Studentov t-test (nsz-nije statisti ki zna ajno, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

		3 nedelje							
		Se+				Se-			
		PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
Se+	PTU ⁻ IA ⁻		nsz	**	nsz	*	nsz	nsz	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺			*	nsz	**	**	**	*
	PTU ⁺ IA ⁻				**	***	***	***	***
	PTU ⁻ IA ⁺					***	**	**	*
Se-	PTU ⁻ IA ⁻						nsz	nsz	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺							nsz	nsz
	PTU ⁺ IA ⁻								nsz
	PTU ⁻ IA ⁺								
		7 nedelja							
		Se+				Se-			
		PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
Se+	PTU ⁻ IA ⁻		nsz	nsz	nsz	***	***	***	***
	PTU ⁺ IA ⁺			nsz	nsz	***	***	**	***
	PTU ⁺ IA ⁻				nsz	***	***	***	***
	PTU ⁻ IA ⁺					***	**	**	***
Se-	PTU ⁻ IA ⁻						***	***	nsz
	PTU ⁺ IA ⁺							nsz	***
	PTU ⁺ IA ⁻								***
	PTU ⁻ IA ⁺								

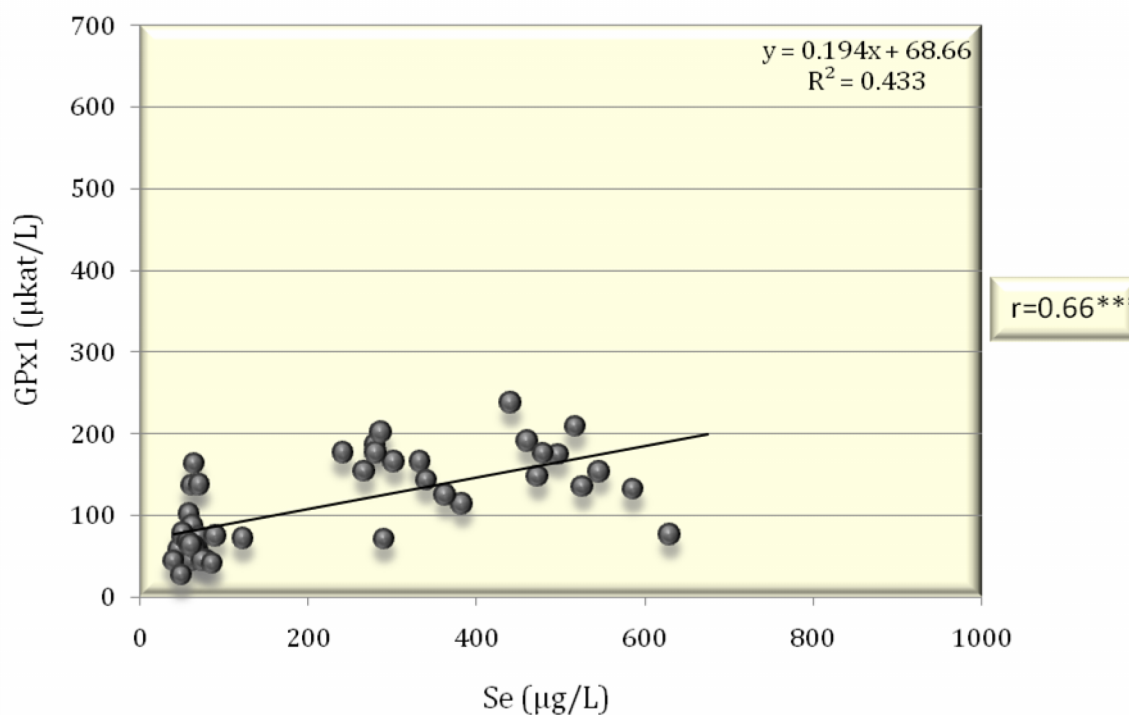
U tabeli 5.8.4. je prikazana zna ajnost razlika u aktivnosti GPx3 izme u jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja. Osim kod ogledne grupe 3 (Se⁺PTU⁺IA⁻), u svim selenadekvatnim grupama (1, 2 i 4) je statisti ki zna ajno porasla aktivnost GPx3 tokom vremena. Kod selendeficitnih jedinki, aktivnost ove peroksidaze je ostala na istom nivou kod grupa 5, 6 i 8. Kod ogledne grupe 7 (Se⁻PTU⁺IA⁻), došlo je do statisti ki zna ajnog porasta aktivnosti GPx3.

Tabela 5.8.4. Zna ajnost razlika u aktivnosti plazmatske glutation peroksidaze (GPx3) izme u jedinki tretiranih 3 i 7 nedelja, Studentov t-test.

Se+				Se-			
PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	PTU ⁺ IA ⁺	PTU ⁺ IA ⁻	PTU ⁻ IA ⁺
p<0,01	p<0,05	nsz	p<0,01	nsz	nsz	p<0,05	nsz

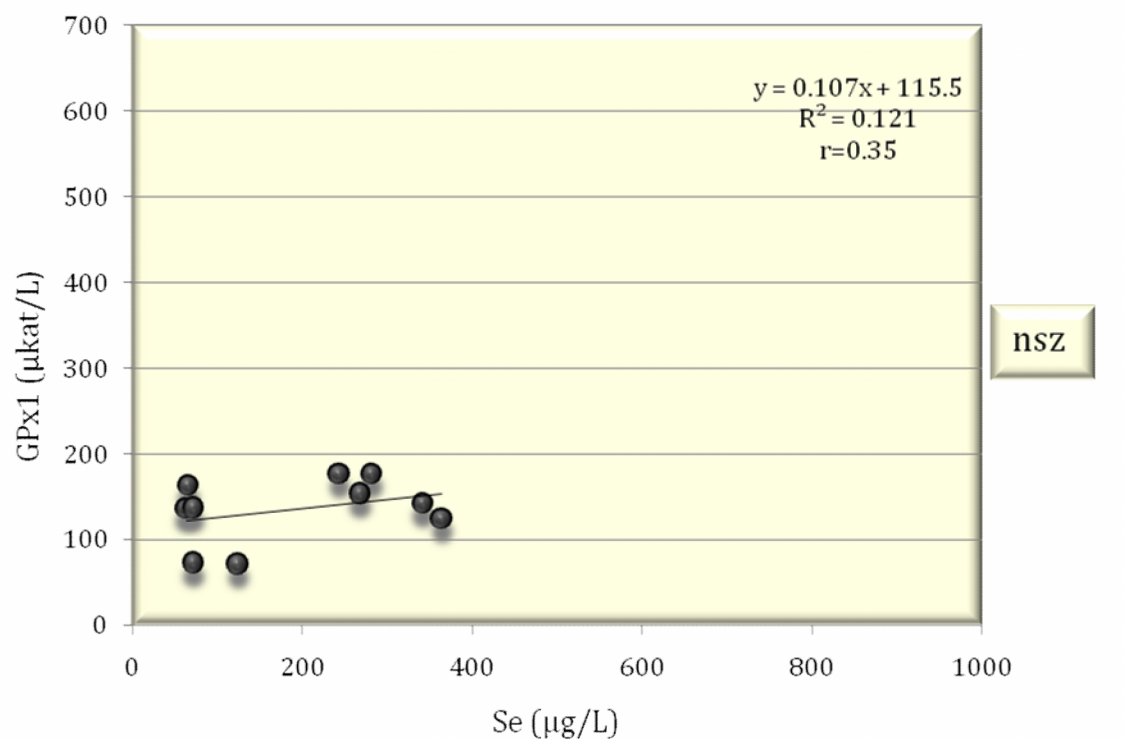
5.9. Korelaciona zavisnost izme u koncentracije selena u punoj krvi pacova i aktivnosti glutacion peroksidaze 1 (GPx1)

Visok koeficijent korelacije ($r=0,66$, $p<0,01$) uo en je izme u nivoa selena u krvi i aktivnosti citosolne glutacion peroksidaze (GPx1) kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki ve nakon tri nedelje tretmana (Grafikon 5.9.1.).



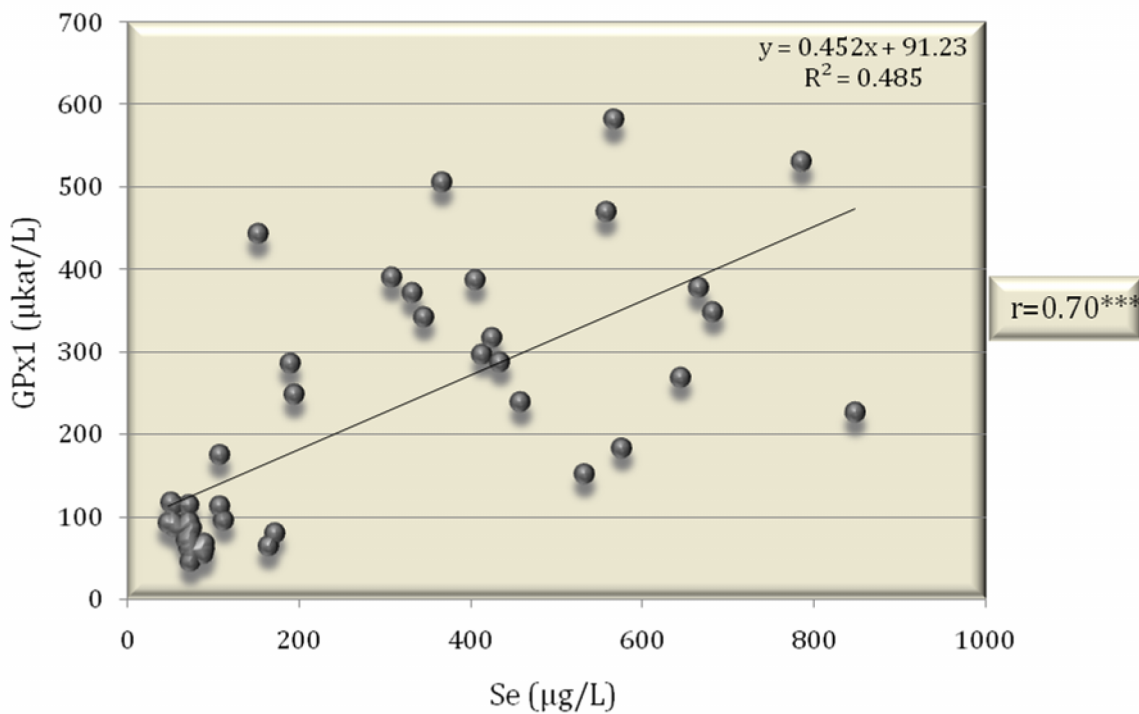
Grafikon 5.9.1. Korelaciona zavisnost koncentracije selena u krvi i aktivnosti citosolne glutacion peroksidaze 1 (GPx1) kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki nakon tri nedelje tretmana ($***p < 0.01$).

Izvide i korelacionu zavisnost pojedina no po tretmanima, nakon tri nedelje tretmana je postojala korelaciona zavisnost izme u ova dva parametra kod svih tretmana osim pri istovremenoj upotrebi oba blokatora. Koeficijenti korelacije su iznosili $r=0,81$ (selenadekvatne i selendeficitne jedinke); $r=0,83$ (selenadekvatne i selendeficitne jedinke tretirane sa PTU); $r=0,78$ (selenadekvatne i selendeficitne jedinke tretirane sa IA). U grupi tretiranoj istovremeno sa oba blokatora (PTU i IA), koeficijent korelacije je bio izrazito nizak ($r=0,35$) i nije bio statisti ki zna ajan (Grafikon 5.9.2.)



Grafikon 5.9.2. Korelaciona zavisnost koncentracije selena u krvi i aktivnosti citosolne glutation peroksidaze 1 (GPx1) kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki istovremeno tretiranih sa PTU i IA, nakon tri nedelje tretmana (grupe 2 i 6) (nsz-nije statisti ki zna ajno).

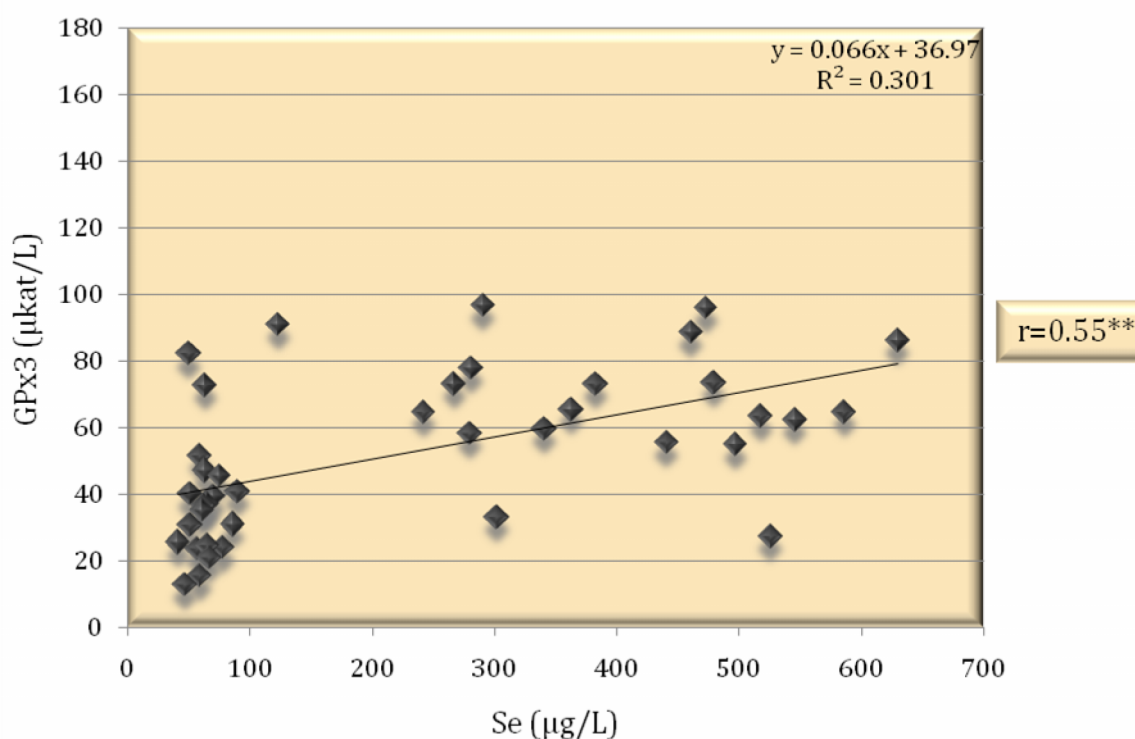
Nakon sedam nedelja tretmana je uo ena visoka korelaciona zavisnost izme u ova dva parametra, sa koeficijentom korelacije 0,7 (p 0,01) (Grafikon 5.9.3.). Posmatraju i pojedina ne tretmane, uo ena je korelaciona zavisnost kod svih tretmana, a koeficijenti korelacije su iznosili $r=0,83$ (selenadekvatne i selendeficitne jedinke, p 0,01); $r=0,79$ (selenadekvatne i selendeficitne jedinke tretirane sa PTU, p 0,01); $r=0,89$ (selenadekvatne i selendeficitne jedinke tretirane sa IA, p 0,01) i $r=0,84$ (selenadekvatne i selendeficitne jedinke tretirane sa PTU i IA, p 0,02).



Grafikon 5.9.3. Korelaciona zavisnost koncentracije selena u krvi i aktivnosti citosolne glutation peroksidaze 1 (GPx1) kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki nakon sedam nedelja tretmana (**p 0,01).

5.10. Korelaciona zavisnost izme u koncentracije selena i aktivnosti glutacion peroksidaze 3 (GPx3) u krvnoj plazmi pacova

Korelaciona zavisnost je uo ena izme u nivoa selena u krvi i aktivnosti plazmatske glutacion peroksidaze (GPx3) kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki ve nakon tri nedelje tretmana (Grafikon 5.10.1.) pri emu je koeficijent korelacije iznosio $r=0,55$, ($p<0,01$).

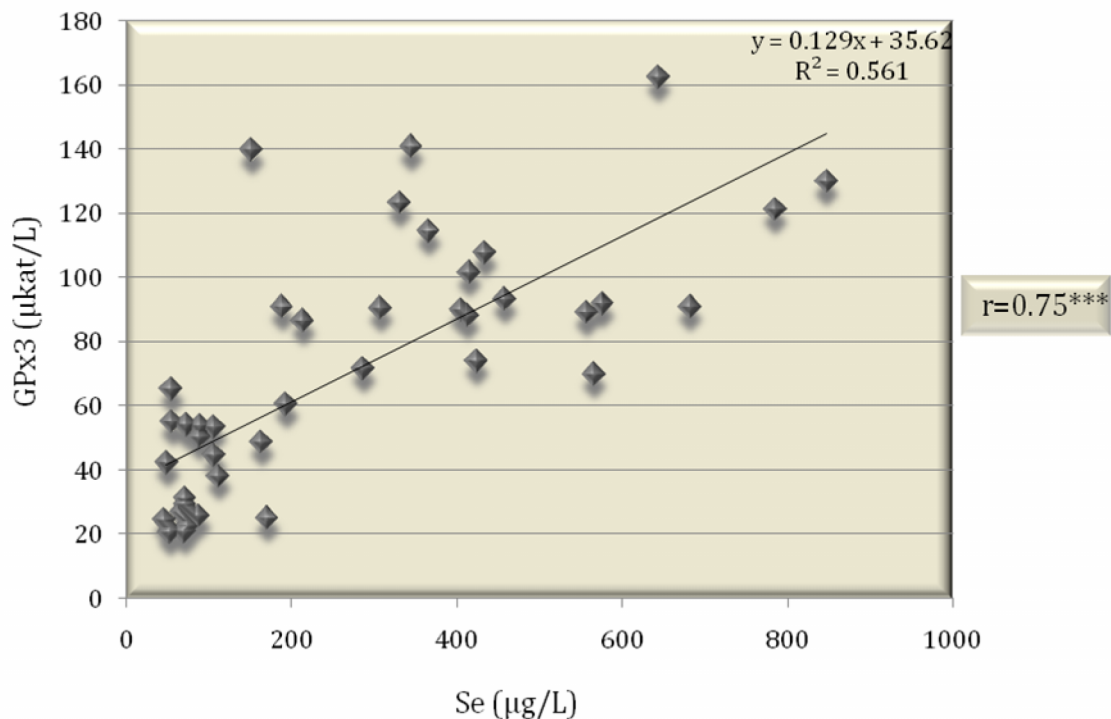


Grafikon 5.10.1. Korelaciona zavisnost koncentracije selena u krvi i aktivnosti plazmatske glutacion peroksidaze 3 (GPx3) kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki nakon tri nedelje ekperimenta (svi tretmani) (***) ($p < 0.01$)

Posmatraju i pojedina ne tretmane, kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki netretiranih sa blokatorima, koeficijent korelacije je iznosio $r=0,81$ ($p<0,01$); kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki tretiranih sa propiltiouracilom $r=0,78$ ($p<0,05$); kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki tretiranih sa jopanoi nom kiselinom $r=0,92$

($p < 0,01$), a kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki tretiranih sa oba blokatora (PTU i IA) $r = 0,82$ ($p < 0,05$).

Nakon sedam nedelja eksperimenta, koeficijent korelacije izme u ovih parametara je bio zna ajno visok i iznosio je $0,75$ ($p < 0,01$), (Grafikon 5.10.2.).



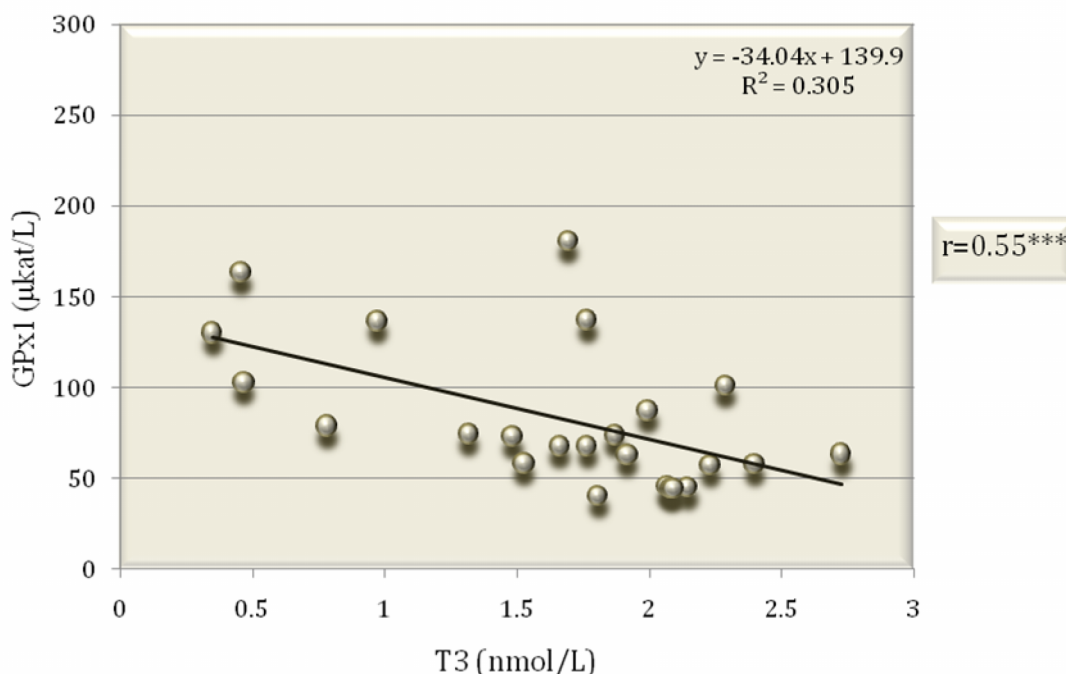
Grafikon 5.10.2. Korelaciona zavisnost koncentracije selena u krvi i aktivnosti plazmatske glutation peroksidaze 3 (GPx3) kod selendeficitnih i selenadekvatnih jedinki nakon 7 nedelja tretmana ($***p < 0,01$).

Izvide i korelacionu zavisnost pojedina no po tretmanima, nakon sedam nedelja tretmana, utvr ena je korelaciona zavisnost izme u ova dva parametra kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki, $r = 0,92$ ($p < 0,05$) i kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki tretiranih sa jopanoi nom kiselinom, $r = 0,98$ ($p < 0,05$) (Grafikon 5.10.3.). Pri upotrebi propiltiouracila kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki, koeficijent korelacije je iznosio $r = 0,62$ i nije bio statisti ki zna ajan kao ni pri istovremenoj upotrebi oba blokatora (PTU i IA) kada je koeficijent korelacije iznosio $r = 0,60$ i tako e nije bio statisti ki zna ajan.

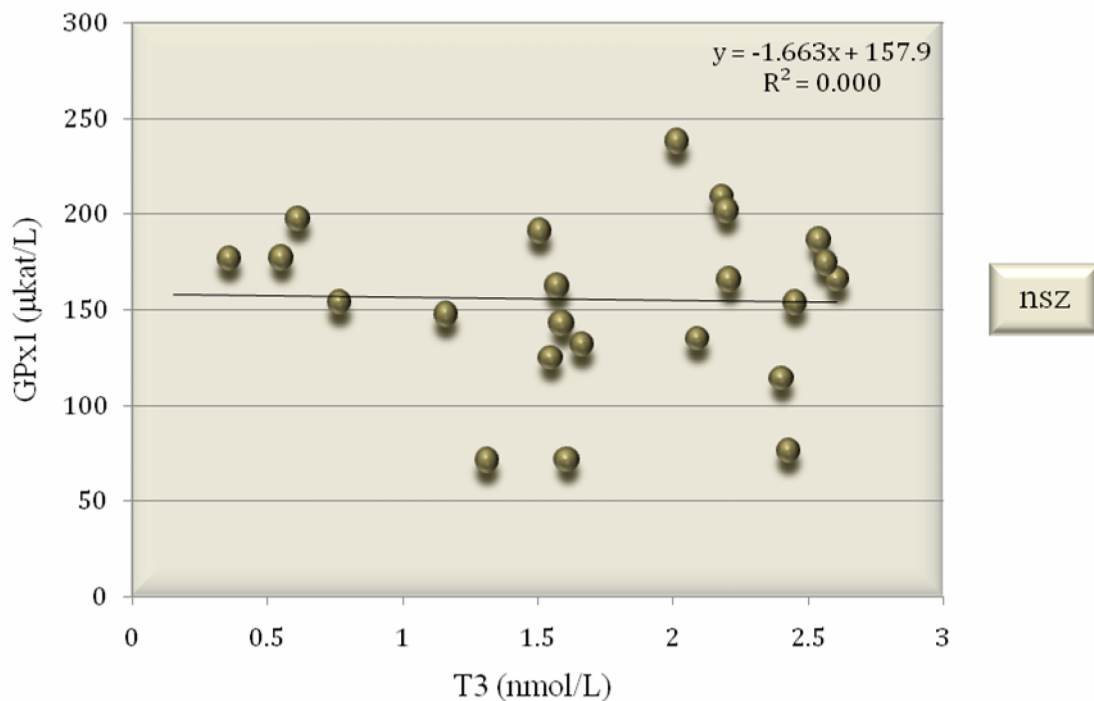
5.11. Korelaciona zavisnost izme u koncentracije tireoidnih hormona i aktivnosti glutation peroksidaza 1 i 3

Negativna korelaciona zavisnost izme u koncentracije T3 u krvnoj plazmi i aktivnosti GPx1 se javila kod selendeficitnih jedinki ve nakon tri nedelje tretmana, sa koeficijentom korelacije $r=0,55$, $p<0,01$ (Grafikon 5.11.1.). U istom periodu postojala je i negativna korelaciona zavisnost izme u koncentracije tiroksina (T4) i aktivnosti ovog enzima kod selendeficitnih jedinki sa vrednoš u koeficijenta korelacije od $r=0,58$ ($y=-0.538x+147,9$; $R^2=0.338$; $p<0,05$). Kod selenadekvatnih jedinki nakon tri nedelje tretmana nije postojala korelaciona zavisnost izme u T3 i GPx1 (Grafikon 5.11.2.) ni izme u T4 i GPx1 ($r=0,13$).

Nakon sedam nedelja tretmana, nije uo ena korelaciona zavisnost izme u T3 i GPx1 ni kod selenadekvatnih niti kod selendeficitnih jedinki. U istom periodu, nije zabeležena ni korelaciona zavisnost izme u T4 i GPx1 kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki.



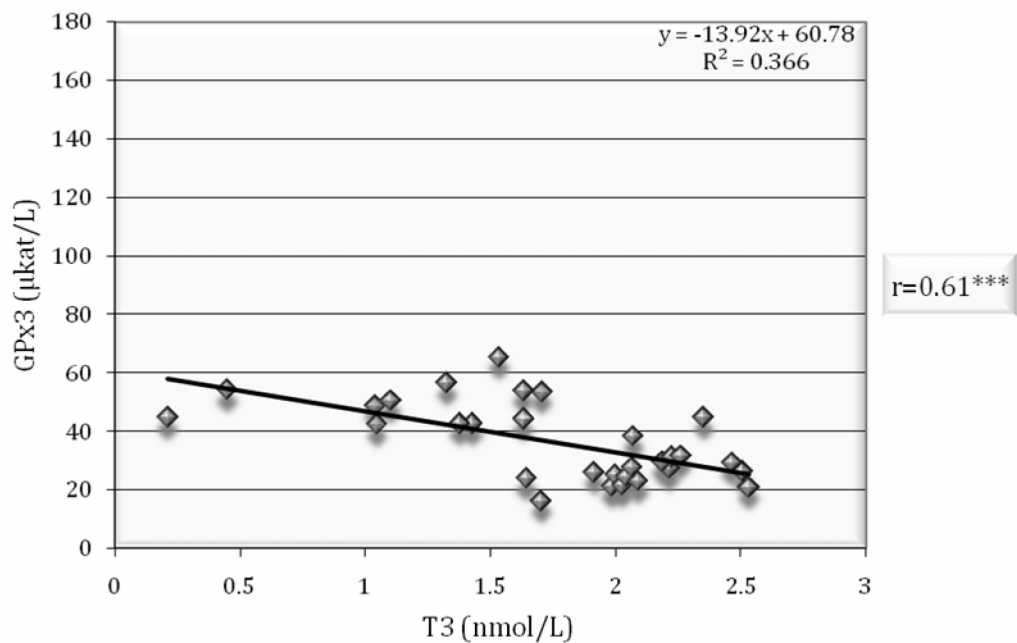
Grafikon 5.11.1. Korelaciona zavisnost T3 u krvnoj plazmi i aktivnosti citosolne glutation peroksidaze 1 (GPx1) kod selendeficitnih jedinki nakon 3 nedelje tretmana (**p 0,01).



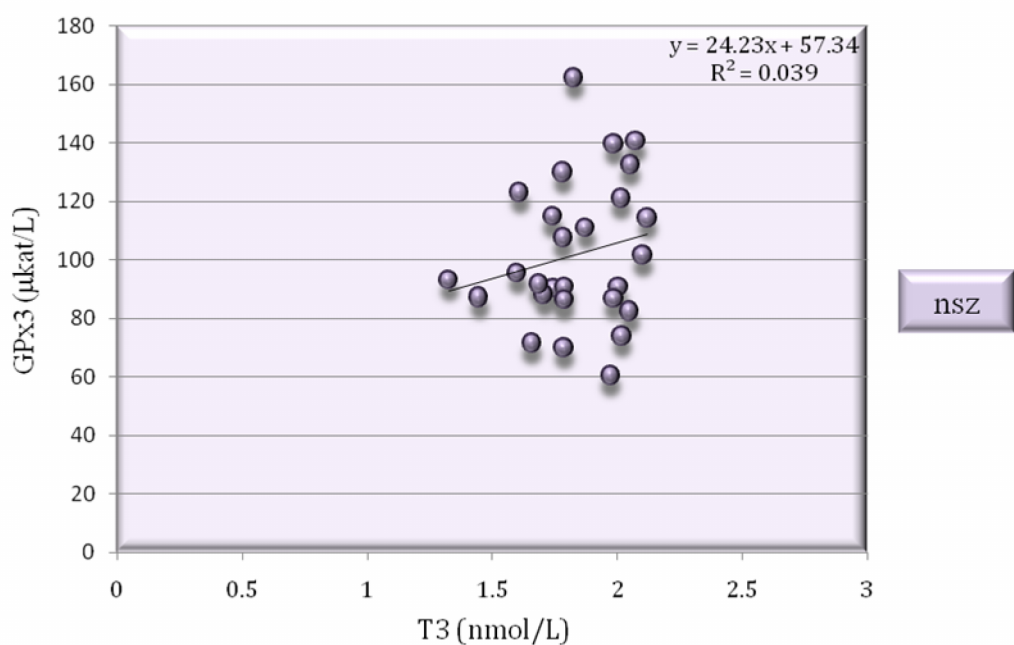
Grafikon 5.11.2. Korelaciona zavisnost T3 u krvnoj plazmi i aktivnosti citosolne glutation peroksidaze 1 (GPx1) kod selenadekvatnih jedinki nakon 3 nedelje tretmana, (nsz-nije statisti ki zna ajno).

Nakon tri nedelje tretmana nije uo ena korelaciona zavisnost izme u koncentracije T3 u krvnoj plazmi i aktivnosti GPx3 ni kod selenadekvatnih niti kod selendeficitnih jedinki. Tako e, nije uo ena korelaciona zavisnost izme u T4 i GPx3 kod selenadekvatnih niti kod selendeficitnih jedinki.

Nakon sedam nedelja tretmana, kod selendeficitnih jedinki je uo ena negativna korelacija izme u T3 i GPx3 sa visokim koeficijentom korelacije, $r=0,61$ ($p<0,01$) (Grafikon 5.11.3.). Izme u T4 i GPx3 je tako e postojala negativna korelaciona zavisnost kod selendeficitnih jedinki ($y=-0,256x+49,37$; $R^2=0,731$; $r=0,86$; $p<0,01$). Kod selenadekvatnih jedinki, nakon sedam nedelja tretmana, nije postojala korelaciona zavisnost T3 i GPx3 (Grafikon 5.11.4.). U istom periodu nije zabeležena ni korelaciona zavisnost izme u T4 i GPx3 kod selenadekvatnih jedinki.



Grafikon 5.11.3. Korelaciona zavisnost T3 u krvnoj plazmi i aktivnosti plazmatske glutation peroksidaze 3 (GPx3) kod selendeficitnih jedinki nakon 7 nedelja tretmana (** $p < 0,01$).



Grafikon 5.11.4. Korelaciona zavisnost T3 u krvnoj plazmi i aktivnosti plazmatske glutation peroksidaze 3 (GPx3) kod selenadekvatnih jedinki nakon 7 nedelja tretmana, (nsz-nije statisti ki zna ajno).

6. Diskusija

6.1. Telesne mase pacova

Merenje telesne mase oglednih životinja vršeno je svakih sedam dana od ulaska jedinki u ogled. Na početku eksperimenta (0 dan) izmjerena je masa svih oglednih životinja i u proseku je iznosila $48,6 \pm 7,8$ g. Nakon dve nedelje eksperimenta, selendeficitne jedinke su imale nižu prosečnu telesnu masu za 13%, a na kraju eksperimenta za 8%. U eksperimentima Beckett-a i sar. (1989), Bates-a i sar. (2000), Barnes-a i sar. (2009) deficit selena nije uticao na telesne mase ispitivanih jedinki. Međutim, Hurt (1971), navodi u svom radu da su selendeficitne jedinke imale niže telesne mase u odnosu na selenadekvatne i to za oko 13%.

Već nakon nedelju dana selendeficitne jedinke tretirane propiltiouracilom (PTU) su imale niže telesne mase u odnosu na kontrolnu grupu za 17%, što je bilo statistički značajno ($p < 0,05$). Ovakav trend se nastavio i druge nedelje pri čemu je razlika u telesnim masama između ovih grupa bila još izraženija, kada su selendeficitne jedinke imale za 26% nižu telesnu masu ($p < 0,001$). Tek pete nedelje tretmana, selenadekvatna grupa tretirana sa PTU je imala statistički značajno niže telesne mase od kontrolne grupe (za 11%). U istom periodu je selendeficitna grupa tretirana sa PTU imala za 49% niže telesne mase. Nakon sedam nedelja tretmana, selenadekvatna grupa tretirana sa PTU je imala za 19%, a selendeficitna grupa tretirana sa PTU za 59% niže telesne mase u odnosu na kontrolnu grupu. U radu Yoshida i Nakazona (1995) jedinke tretirane sa PTU imaju oko 2,5 puta nižu telesnu masu od jedinki iz kontrolne grupe. Kod grupa tretiranih sa PTU je ustanovljena hipotireoza sa izrazito niskim koncentracijama T4 u krvi. Pored toga, poznato je da PTU blokira dejodinazu 1 i smanjuje koncentraciju T3. Kako je poznato da tireoidni hormoni imaju veliki uticaj na metaboličke procese u toku rasta i diferencijacije, zaostajanje u rastu jedinki tretiranih sa PTU je bilo očekivano. Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da hipotireoza udružena sa deficitom selena izaziva usporeniji rast jedinki nego kada je u pitanju samo hipotireoza ili samo deficit selena.

Selendeficitna grupa tretirana sa jopanojnom kiselinom (IA) je imala prosečnu istu telesnu masu kao i selendeficitne jedinke koje nisu dobijale blokator. Takođe,

selenadekvatne jedinke tretirane sa IA su imale slične telesne mase kao i kontrolna grupa. U ovim grupama nije ustanovljena sistemska hipotireoza te nisu bile otkrivane promene telesnih masa tretiranih jedinki.

6.2. T4

Radi utvrđivanja uticaja blokatora dejodinaza na tireoidnu osovinu selendeficitnih i selenadekvatnih juvenilnih pacova, korišćeni su propiltiouracil i jopanoi na kiselina.

Jopanoi na kiselina ima benzenov prsten sa 3 atoma joda i aminogrupom i pokazuje visok stepen rastvorljivosti u mastima (Braga i Cooper, 2001). Od 1951. godine se upotrebljava kao sredstvo za holecistografiju. Nakon što su Bürgi i saradnici (1976) uočili smanjenje koncentracije T3 u krvi i povećanje T4 i TSH kod pacijenata koji su dobili IA kao sredstvo za holecistografiju, poela su istraživanja vezana za mehanizam dejstva i eventualnu upotrebu kod hipertireoza. Utvrđeno je da jopanoi na kiselina blokira dejodinaciju T4 u T3 i u homogenatima jetre (Kaplan i Utiger, 1978) i u homogenatima bubrega (Silva i sar., 1978) što je kasnije (Germain, 1988b) ukazalo na inhibiciju dejodinaze 1 (ID1). Ovaj blokator inhibira i dejodinaciju u hipofizi i masnom tkivu (Courtin i sar., 1985), a u radu Germaina (1988a) je pokazano da inhibira dejodinazu 2 (ID2). U *in vitro* uslovima je dokazana kompetitivna inhibicija konverzije T4 u T3 u homogenatima jetre kao i inhibicija degradacije rT3 (Chopra, 1977) sa jopanoi na kiselinom. Međutim, kod pacova *in vivo* je utvrđena nekompetitivna inhibicija (Germain, 1988a). Ovaj autor je pokazao da se sa intravenskom aplikacijom jopanoi na kiseline u dozi od 4 mg/100g TM pacova, može izazvati pad maksimalne brzine enzimske reakcije za 66%, a da Km ostaje nepromenjena. Inhibicija je zabeležena neposredno nakon aplikacije, bila je maksimalna nakon 5 sati, a trajala je više od 60 sati. Zabeležena je i *in vivo* ireverzibilna inhibicija konverzije T4 u T3 u hipofizi pacova sa dozom od 5 mg/100g TM pacova i na taj način potvrđena inhibicija dejodinaze 2 (ID2). Isti autor navodi da je ID2 osetljivija na dejstvo jopanoi na kiseline od ID1 i da se sa dozom od svega 0.04 mg/100g TM inaktivira 80% ID2 u hipofizi i korteksu velikog mozga. Osim inhibicije ID2, jopanoi na kiselina bi mogla inhibirati i

sam unos T4 u krvi. Westholm (2009) dokazuje inhibični efekat jodovane kiseline na unos T4 pomoću polipeptidnih transportera organskih anjona u kulturama hepatocita.

Drugi blokator koji smo koristili u radu, propiltiouracil, pripada tioamidnim lekovima koji se koriste u lečenju hipertireoidizma. Pominju se dva mehanizma kojima PTU smanjuje proizvodnju tireoidnih hormona. Prvi podrazumeva blokadu tireocitne peroksidaze koja oksiduje jod (I^{-1} u I^{0}) i ugrađuje ga u tirozil ostatke tireoglobulina (Engler i sar., 1983). Drugi mehanizam je inhibicija ID1 koja je odgovorna za konverziju T4 u T3. Veronikis i saradnici (1996) su ispitivali uticaj različitih koncentracija PTU na inhibiciju ID1 u homogenatima jetre pri čemu je sa sve tri doze, 0,01%, 0,05 ili 0,1% PTU u hrani, procenat inhibicije ID1 bio preko 90%. Shang i sar. (2010) pri upotrebi PTU beleže pad mRNA za tireoglobulin pa bi ovo bio možda i drugi mehanizam kojim se utiče na proizvodnju tireoidnih hormona. Preporučene doze PTU za izazivanje hipotireoze kod pacova su 0,01%-0,1% (Veronikis i sar., 1996) pa je sa dozom od 150 mg/L vode za piće (0,015%) u našem eksperimentu sigurno postignut ovaj efekat. Radovanović (2003) izaziva hipotireozu kod mladunaca pacova sa dozom koja je čak 100 puta niža od doze upotrebljene u našem eksperimentu (0,00015%).

Prosečna koncentracija tiroksina T4 u krvi kontrolne grupe ($Se^{+}PTU^{-}IA^{-}$) je nakon tri nedelje bila u fiziološkim granicama i iznosila je $85,94 \pm 23,69$ nmol/L. Kod selendeficitnih jedinki ($Se^{-}PTU^{-}IA^{-}$) nivo T4 je bio kao kod kontrolne grupe i iznosio je $85,65 \pm 11,05$ nmol/L. Iako se pri deficitu selena javlja povišen nivo T4 u krvi ogleđnih jedinki (Beckett i sar., 1989), tretman od tri nedelje nije bio dovoljan za razvoj deficita. Kako navode Hill i sar. (1987), za razvoj deficita je potrebno 6 nedelja. Nakon sedam nedelja tretmana je u grupi sa deficitom selena registrovana povišena koncentracija T4 u odnosu na selenadekvatnu grupu, što je u skladu sa radom Becketta i sar. (1989) i Yoshida i Nakazona (1995). Pojava više koncentracije T4 kod selendeficitnih jedinki se objašnjava smanjenom ekstratireoidalnom konverzijom T4 u T3 kao posledica smanjene aktivnosti ID1 (Bermano i sar., 1995).

Upotreba PTU dovodi do statistički značajnog sniženja koncentracije T4 kod selenadekvatnih jedinki. Nakon tri nedelje zabeležen nivo T4 u $Se^{+}PTU^{+}IA^{-}$ grupi je iznosio $27,17 \pm 6,07$ nmol/L, a nakon sedam nedelja je bio $14,78 \pm 6,48$ nmol/L što je u potpunosti u skladu sa rezultatima Cettour-Rose i sar. (2005). PTU dovodi do smanjenja T4 u krvi prvenstveno blokirajući sintezu samog T4 u štitastoj žlezdi (inhibira tireocitnu

peroksidazu) što potvrđuje rad navedenih autora kada je nakon dodavanja T4 pacovima tretiranim sa PTU, njegova koncentracija u krvi ostala ista.

Kod selendeficitnih ($\text{Se}^{-}\text{PTU}^{+}\text{IA}^{-}$) jedinki upotreba PTU je dovela do još izraženijeg pada koncentracije T4 koja je nakon tri nedelje iznosila $18,46 \pm 8,74$ nmol/L, a nakon sedam nedelja je bila ispod granica detekcije upotrebljenog RIA kita. Da blokator i selen u interakciji utiču na nivo T4, pokazala je i dvofaktorska analiza varijanse (Tabela 5.2.3.). Niže vrednosti T4 kod selendeficitnih jedinki tretiranih sa PTU su zabeležili i Chanoine i sar. (1992) i Yoshida i Nakazono (1995), ali ova pojava nije objašnjena. Beckett i sar. (1993) navode da se prilikom deficita selena u štitastoj žlezdi smanjuje količina joda kao i ukupna količina T4 smatraju i ovaj efekat selena protektivnim. Ukoliko bi proizvodnja tireodnih hormona bila oštećena, to bi podrazumevalo i proizvodnju peroksida, a kako je zbog deficita selena narušena aktivnost GPx3 koja uklanja višak peroksida (Howie i sar., 1995), peroksid bi doveo do lokalnog oštećenja tkiva tireoideje. Nije poznato na koji način deficit selena dovodi do smanjenja količine joda u štitastoj žlezdi jer do sada nije utvrđeno da bilo koji selenoenzim učestvuje u transportu joda i sintezi tiroksina.

Tretman selenadekvatnih jedinki sa jopanoi nom kiselinom je doveo do povećanja koncentracije T4 u krvi, a statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolnu grupu je bilo zabeleženo nakon sedam nedelja kada je koncentracija T4 iznosila $84,44 \pm 21,58$ nmol/L ($64,65 \pm 9,07$ nmol/L u kontrolnoj grupi). Isti efekat je uočen i kod selendeficitnih jedinki tretiranih sa IA ($\text{Se}^{-}\text{PTU}^{-}\text{IA}^{+}$). Kako jopanoi ne kiselina blokira sve tri dejodinaze pri čemu je ID2 najosetljivija, smanjena tkivna konverzija T4 u T3 mogla bi biti uzrok povećanja T4 u krvi. Takođe, povišenje koncentracije T4 moglo bi biti posledica dejstva jopanoi ne kiseline na centralnu tireoidnu osovinu, odnosno na aktivnost ID2 u hipotalamusu i hipofizi. Kako je pri upotrebi jopanoi ne kiseline inhibirana aktivnost ID2, manja je koncentracija T3 u odeljima hipotalamusa i hipofize. Niska koncentracija T3 u ovim odeljima utiče na pojačanu sintezu TRH i TSH. Viša koncentracija TSH (Grafikoni 5.4.1 i 5.4.2) je impuls za pojačanu sintezu tireoidnih hormona. Treći mehanizam koji bi mogao uticati na povećanje nivoa T4 je inhibicija transportera odgovornih za unos T4 u odelje (Westholm i sar., 2009). Ovo bi moglo biti objašnjenje i za nešto višu koncentraciju T4

kod jedinki koje su istovremeno dobijale i PTU i IA u odnosu na jedinke koje su dobijale samo PTU.

6.3. T3

U kontrolnoj grupi ($Se^{+}PTU/IA^{-}$) je zabeležena prosečna koncentracija T3 od $2,23 \pm 0,32$ nmol/L nakon tri nedelje tretmana. Fiziološke vrednosti trijodtironina u krvi pacova kreću se od 1,55 nmol/L (Cettour-Rose i sar., 2005) do 3,29 nmol/L (Chunxiang i sar., 2008) te su vrednosti T3 u krvi ogleđnih jedinki kontrolne grupe bile u fiziološkim granicama. Kod grupe sa deficitom selena ($Se^{-}PTU/IA^{-}$), zabeležena je svega 14% manja prosečna koncentracija T3 ($1,92 \pm 0,29$ nmol/L). U ovoj grupi je otkrivana znatno niža vrednost T3 imajući u vidu to da je za proizvodnju ovog hormona odgovorna ID1 koja je selenoenzim. U radu Beckett-a i saradnika (1989) pri korišćenju hrane sa 0,005 mg/kg selena (0,03 mg/kg selena našem eksperimentu), zabeležen je pad koncentracije T3 od 22% u odnosu na kontrolnu selenadekvatnu grupu, ali ovo smanjenje nije bilo statistički značajno. Razlika u procentima može se objasniti različitom koncentracijom selena u hrani (u našem eksperimentu je korišćena hrana deficitarna u selenu koja ima 6 puta veća koncentraciju selena u odnosu na hranu korišćenu u radu Beckett-a). Iako je dejodinaza osetljiva na deficit selena, ovo se prevashodno odnosi na dejodinazu u hepatocitima i bubrezima (Beckett i sar., 1989; Chanoine i sar., 1992) jer se u ovim organima drastično smanjuje količina selena. Međutim, ovo nije slučaj i sa štitastom žlezdom koja je prilično otporna na deficit selena pa je izvesno da ID1 tireoideje nadoknađuje pad aktivnosti ID1 u jetri. U prilog ovoj tvrdnji ide ujednaćen stepen konverzije tiroksina u T3 ($T3/T4 \times 100$) i kod selendeficitne ($Se^{-}PTU/IA^{-}$) i kod selenadekvatne ($Se^{+}PTU/IA^{-}$) grupe nakon tri i nakon sedam nedelja tretmana (Tabela 5.5.1.).

Statistički značajno smanjenje koncentracije T3 je zabeleženo u selenadekvatnoj grupi tretiranoj sa propiltiouracilom (PTU), a koncentracija je bila $1,2 \pm 0,40$ nmol/L. Ovaj blokator ne samo da snažnije blokira konverziju T4 u T3 već inhibira sintezu i samog T4 delujući na tireoidnu peroksidazu, što je dovelo do statistički značajnog pada i koncentracije T3 i koncentracije T4 (grafikon 5.2.2.1). Cettour-Rose i sar. (2005) takođe beleže značajan pad koncentracije T3 u krvi jedinki tretiranih sa PTU. Pri

upotrebi ovog blokatora zajedno sa T4 uspostavljena je normalna koncentracija T4 u krvi, ali je bio evidentan pad T3. U odnosu na kontrolnu grupu, izmerena aktivnost ID2 je bila nepromenjena, ali je i pored toga zabeležen visok nivo TSH. Ovo je ukazalo na regulaciju lučenja TSH ne samo pomoću intracelularne konverzije T4 u T3 u ćelijama hipofize već i u zavisnosti od nivoa serumskog T3.

Jopanoi na kiselinu u ovom periodu nije imala uticaj na koncentraciju T3 u krvi selenadekvatnih jedinki koja je u ovoj eksperimentalnoj grupi iznosila $2,31 \pm 0,19$ nmol/L. Po protokolu koji su predložili Lanni i saradnici (1996), jopanoi na kiselinu se aplikuje pacovima intraperitonealno jednom nedeljno u dozi od 6 mg/100g telesne mase, pri čemu izaziva pad koncentracije T3 za 20-30% nakon tri nedelje tretmana. Životinje su bile žrtvovane 12h nakon poslednje aplikacije IA. Ovaj protokol je bio primenjen u našem eksperimentu s tom razlikom što su životinje bile žrtvovane 24 i 48h nakon poslednje aplikacije IA. Kako se efekat jopanoi na kiseline zadržava i preko 60h nakon aplikacije (Germain, 1988b), smatrali smo da ovo neće uticati na rezultate, odnosno, da će pad koncentracije T3 biti izražen. Larsen i saradnici (1979) rade i sa tireoidektomisanim pacovima, nakon aplikacije T3 i T4 uo avaju viši nivo T3 kod jedinki kojima je aplikovana IA, smatraju i da je ovo posledica inhibicije enzima odgovornih za klirens T3 (dehidrogenaze 1 i 3). Delimično bi ovu dilemu mogli otkloniti rezultati koncentracije rT3 koju nismo bili u mogućnosti da odredimo.

Kod grupe kojoj je aplikovana i IA i PTU nivo T3 je bio niži nego u grupi kojoj je dat samo PTU što je u skladu sa podacima navedenih autora (Lanni i sar., 1996).

Nakon sedam nedelja tretmana, prosečna koncentracija T3 u krvi jedinki kontrolne grupe je iznosila $1,74 \pm 0,17$ nmol/L i možemo reći da je bila u fiziološkim granicama. Bez obzira na tretman (PTU⁺ ili IA⁺), sve selenadekvatne jedinice su imale ujednačene prosečne koncentracije T3. Zapaženo je i da je pad koncentracije T3 manji u odnosu na pad koncentracije T4 koja je u ovom periodu bila izrazito niska. U literaturi su zastupljene studije u kojima se vrše analize tireoidnog statusa jedinki nakon tronedeljne upotrebe propiltiouracila. Međutim, Li Sui i Gilbert (2003) u eksperimentu na skotnim ženjkama pacova sa produžetkom tretmana i 30 dana nakon partusa, takođe ne uo avaju razliku u koncentraciji T3 (kod mladunaca je izražena hipotireoza kao i u našem eksperimentu nakon 3 nedelje). Takođe, Hood i sar. (1999) tretiraju i pacove sa različitim dozama PTU, beleže dramatičan pad T3 nakon nedelju dana od početka

aplikovanja blokatora, a zatim porast T3 u narednih 3 nedelje pri čemu jedinke tretirane nižim dozama za tri nedelje imaju isti nivo T3 kao i kontrolna grupa. Na osnovu naših rezultata možemo reći da se zahvaljujući homeostatskim mehanizmima nakon sedam nedelja reguliše nivo T3 u krvi eksperimentalnih jedinki. Silva i sar. (1984) napominju da se u slučaju hipotireoze aktivira dejodinacija pomoću dejodinaze 2 i da se zahvaljujući višestrukom povećanju njene aktivnosti uspeva nadomestiti nedostatak T3. Ostali homeostatski mehanizmi su detaljnije opisani u podpoglavlju o TSH.

Kod selendeficitnih jedinki se, sudeći prema vrednostima T3, uspostavlja homeostaza. Jedino u selendeficitnoj grupi tretiranoj sa PTU ($\text{Se}^{-}\text{PTU}^{+}\text{IA}^{-}$) je evidentan pad T3 ($1,123 \pm 0,54$ mmol/L). Nekoliko je razloga za ovakav rezultat. Kod pacova se u uslovima hipotireoze smanjuje za 50% aktivnost ID1. Na pad njene aktivnosti dodatno utiče deficit selena. Iako se u uslovima hipotireoze aktivnost ID2 povećava nekoliko puta, kako je i ona sama selenoenzim, njena aktivnost se ne povećava u toj meri i ne uspeva da nadomesti T3 kao kod selenadekvatnih jedinki.

6.4. TSH

Koncentracija tireostimulirajućeg hormona u kontrolnoj grupi ($\text{Se}^{+}\text{PTU}^{-}\text{IA}^{-}$) je nakon tri nedelje tretmana iznosila u proseku $2,97 \pm 0,83$ ng/mL i bila je u fiziološkim granicama. Kod jedinki sa deficitom selena ($\text{Se}^{-}\text{PTU}^{-}\text{IA}^{-}$) izmerena je nešto viša koncentracija TSH ($6,57 \pm 3,03$ ng/mL), ali ova razlika nije bila statistički značajna. Iako je u nekim studijama nivo TSH kod selendeficitnih jedinki isti kao i kod selenadekvatnih jedinki (Veronikis i sar., 1996), Ruz i sar. (1999) i Chanoine i sar. (1992) takođe beleže povišenje nivoa TSH i T4 sa nepromenjenom ili malo nižom koncentracijom T3 kod selendeficitnih u odnosu na selenadekvatne jedinke. Ono što zbunjuje jeste da i malo povišenje nivoa T4 obično dovodi do smanjenja nivoa TSH, a što se kod selendeficitnih jedinki ne dešava. Nivo TSH je povezan sa intracelularnom konverzijom T4 u T3 u hipofizi pomoću ID2. Ukoliko je ova konverzija otkrivena, viši nivo T4 izazvao bi viši nivo unutar elijskog T3 koji se vezuje za receptore TSH na DNK, a time vezivanje izaziva inhibiciju sinteze mRNA za TSH. Bates i sar. (2000) navode kako konverzija T4 u T3 u hipofizi kod selendeficitnih jedinki raste što znači da se produkuje veća količina T3 koji prouzrokuje smanjenje nivoa TSH. Sa druge strane,

viši nivo T3 u hipofizi deluje na nivou transkripcije gena ID2 pri čemu se smanjuje količina mRNA za ID2, a to za posledicu ima smanjenu konverziju T4 u T3 pri čemu bito bio impuls za povećanu sintezu TSH. Dakle, uzrok povećanja TSH kod selendeficitnih jedinki mogao bi biti prevaga drugog mehanizma. Iako mnogi autori kao jedini mehanizam regulacije produkcije TSH navode intracelularnu konverziju T4 u T3 u hipofizi, postoji mogućnost da u regulaciji učestvuje i serumski T3 (Cettour-Rose i sar., 2005), što je detaljnije opisano u prethodnom podpoglavlju (6.3.).

Smatra se da je povišenje TSH signal za porast *de novo* sinteze T3 na tireoglobulinu čime se normalizuje koncentracija T3 u krvi. Takođe, TSH učestvuje na povećanje ekspresije ID1 u štitastoj žlezdi koja omogućava viši nivo konverzije T4 u T3. Svi pomenuti kompenzatorni mehanizmi su uticali na rast koncentracije T3 kod selendeficitnih jedinki nakon sedam nedelja tretmana pri čemu se koncentracija T3 u krvi selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki nisu razlikovale.

Pri upotrebi PTU kod selenadekvatnih ($\text{Se}^+\text{PTU}^+\text{IA}^-$) i selendeficitnih ($\text{Se}^-\text{PTU}^+\text{IA}^-$) jedinki zabeležen je višestruki porast TSH u odnosu na kontrolnu grupu i nakon tri i nakon sedam nedelja tretmana (tabela 5.2.4.1., grafikon 5.2.4.1. i 5.2.4.2.). Cettour-Rose i sar. (2005) pri upotrebi propiltiouracila takođe beleže drastično povećanje koncentracije TSH u krvi ispitivanih jedinki. U navedenim grupama je bila zastupljena izrazito niska koncentracija T4, a poznato je da se prilikom hipotireoze javlja povišen nivo TSH kao rezultat negativne povratne sprege koji je već opisan. Statistički značajna razlika u koncentraciji TSH je zapažena između selenadekvatne i selendeficitne grupe tretirane sa PTU pri čemu je nakon sedam nedelja tretmana u selendeficitnoj grupi nivo TSH bio viši nego kod selenadekvatnih jedinki tretiranih sa PTU. Ovaj nalaz je takođe u skladu sa koncentracijom T4 koja je kod selendeficitnih jedinki bila niža nego kod selenadekvatnih jedinki.

Jopanoinska kiselina je dovela do blagog povećanja nivoa TSH, a koje je, kako je pokazao t-test, bilo statistički značajno i nakon tri i nakon sedam nedelja tretmana. Kako je u navedenim grupama nivo T3 bio kao i u kontrolnoj grupi, a nivo T4 statistički značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu, bilo je očekivano smanjenje nivoa TSH. Pošto jopanoinska kiselina blokira konverziju T4 u T3 pomoću ID2 u hipofizi, verovatno je da povišenje serumskog T4 nije mogao biti impuls za sniženje TSH u toj meri.

6.5. Procentualni odnos T3/T4

Odnos T3/T4 je kod eutireoidnih pacova oko 2% (Thompson i sar.,1995). Prema istom autoru se kod selendeficitnih jedinki (0,007 mg Se/kg hrane) ovaj odnos menja i dvostruko je manji. U našem eksperimentu ovaj odnos kod selendeficitnih jedinki je nakon tri i sedam nedelja tretmana bio nešto niži kao posledica blagog pove anja koncentracije T4 u krvi, a bez pada koncentracije T3. Kako su selendeficitne životinje u našem eksperimentu hranjene hranom koja je sadržala 0,03 mg Se/kg hrane, nije bio o ekivan zna ajniji pad odnosa T3/T4.

Hood i sar. (1999) tretiraju i pacove sa razli itim dozama PTU, beleže dramati an pad T3 nakon nedelju dana od po etka aplikovanja blokatora, a zatim porast T3 u narednih 3 nedelje pri emu jedinke tretirane nižim dozama za tri nedelje imaju isti nivo T3 kao i kontrolna grupa. Kako je u grupama tretiranim sa PTU u našem eksperimentu niža koncentracija T4 u odnosu na kontrolnu grupu, odnos T3/T4 raste te nakon tri nedelje iznosi 4,47% kod selenadekvatnih i 10,03% kod selendeficitnih jedinki. Nakon sedam nedelja, kada se u ovim grupama beleži još ve i pad T4, a normalizuje nivo T3, odnos T3/T4 raste i iznosi 15,19% kod selenadekvatnih jedinki. Kod selendeficitnih jedinki tretiranih sa PTU ovaj odnos nije bilo mogu e izra unati zbog niskog nivoa T4, ali je o igledno bio visok, uzimaju i u obzir vrednosti T3. Pove an procenat konverzije kod jedinki tretiranih sa PTU može se objasniti efikasnijom ekstratireoidnom dejodinacijom T4 u T3 pomo u dejodinaze 2, koja je svakako sve efikasnija što je tretman duži, a još je efikasnija u uslovima deficita selena, kada se njena aktivnost tako e pove ava (Bates i sar., 2000).

Kod jedinki tretiranih sa jopanoi nom kiselinom, zabeležen je nešto niži odnos T3/T4 koji je bio posledica povišenja nivoa T4. Isti efekat je zabeležen i kod selendeficitnih i kod selenadekvatnih jedinki i nakon tri i nakon sedam nedelja tretmana.

Upotreba oba blokatora (PTU i IA), nakon tri nedelje tretmana nije dovela do narušavanja odnosa T3/T4 koji je iznosio 2,65% kod selenadekvatnih jedinki. U ovom periodu je kod selendeficitnih jedinki tretiranih sa oba blokatora uo ena pove ana konverzija T4 u T3 zbog ve eg pada koncentracije T4 u odnosu na pad koncentracije T3, a procenat konverzije je iznosio 4,11%. Ovaj nalaz bi mogla objasniti ve pomenuta pove ana aktivnost ID2 u uslovima deficita selena. Nakon sedam nedelja tretmana sa oba blokatora, odnos T3/T4 je bio pove an u odnosu na kontrolnu grupu, ali je bio nešto

niži u odnosu na grupe koje su dobijale samo PTU (Tabela 5.5.1.). Kako je u grupama koje su dobijale oba blokatora bio zabeležen blago povišen nivo T4 u odnosu na grupe tretirane samo sa PTU, ovakav odnos konverzije T4 u T3 je bio o ekivan.

6.6. Status selena

Prou avaju i potrebe za selenom u ishrani životinja, bilo je važno znati njegovu biološku raspoloživost. Mnoga istraživanja su pokazala da od oblika selena u hranivima zavisi biološka raspoloživost kao i deponovanje u tkivima (Whanger i Butler, 1988). Nakon otkri a selenoenzima, potrebe u selenu su po ele da se definišu prema koli ini selena neophodnog za punu aktivnost ovih enzima. U novije vreme se kao konvencionalni parametri za odre ivanje potrebnih koli ina selena u hrani koriste slede i biomarkeri: aktivnost miši ne GPx4, plazmatske GPx3, GPx4 jetre, TrxR jetre, koncentracija Se u jetri, GPx1 eritrocita i jetre, koncentracija Se i aktivnost GPx1 u bubrezima kao i aktivnost GPx1 u miši ima (Barnes i sar., 2009). Aktivnost plazmatske GPx3 i GPx1 eritrocita predstavljaju odli ne biomarkere za procenu statusa selena jer u visokom stepenu koreliraju sa koli inom selena u hrani. Na osnovu vrednosti ovih biomarkera, procenjene su minimalne potrebe u selenu od 0,06 mg Se/kg hrane (plazmatska GPx3) odnosno 0,08 mg Se/kg hrane (GPx1 eritrocita), tako da je ishrana pacova u našem eksperimentu sa 0,3 mg Se/kg hrane u potpunosti obezbe ivala maksimalnu aktivnost ovih enzima kod selenadekvatnih jedinki.

6.6.1. Koncentracija selena u punoj krvi

Razli ite koncentracije selena u hrani kao i razli iti oblici selena dovode do njegovog razli itog deponovanja u tkivima kao što su jetra, miši i, testisi, mozak, bubrezi, plu a, srce, slezina i krv (Whanger i Butler, 1988). Prou avaju i deponovanje selena u navedenim tkivima prilikom davanja pacovima 0,02, 0,2, 1,0 i 4 mg Se/kg hrane, ovi autori su nakon devet nedelja uo ili višestruko pove anje koli ine selena u krvi kod grupa kojima je data koli ina 0,2 i 1 mg Se/kg hrane ($0,5 \pm 0,06$ i $0,6 \pm 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ selena u krvi) u odnosu na grupu koja je hranom dobijala 0,02 mg Se/kg hrane

($0,03 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$ selena u krvi). Grupe koje su dobijale 2,0 i 4,0 mg Se/kg hrane, nisu imale značajno veće vrednosti koncentracije selena u krvi u odnosu na grupu koja je dobijala 0,2 mg Se/kg hrane. Ogledne jedinice u našem eksperimentu su hranom dobijale 0,031 mg Se/kg hrane (selendeficitna ishrana) odnosno 0,334 mg Se/kg hrane (selenadekvatna ishrana), te je razlika u koncentraciji selena u krvi eksperimentalnih jedinica bila neznatna. Nakon tri nedelje eksperimenta, selendeficitne jedinice su imale nižu koncentraciju selena u krvi ($58,17 \pm 8,26$ $\mu\text{g/L}$) u odnosu na kontrolnu grupu - $364,8 \pm 98,06$ $\mu\text{g/L}$, sa utvrđenom statistički značajnom razlikom na nivou $p < 0,001$.

Zapaženo je takođe da su selenadekvatne jedinice tretirane propiltiouracilom ili jopanojnom kiselinom imale više koncentracije selena u krvi ($477,7 \pm 105,4$ i $458,5 \pm 105,8$ $\mu\text{g/L}$) u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 5.1.1.1), iako t-test nije pokazao statističku značajnost. Međutim, dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da su u ovom periodu na koncentraciju selena u krvi uticali i količina selena u hrani i primena blokatora (samostalno ili u kombinaciji sa selenom, Tabela 5.6.3.). Kako u dostupnoj literaturi nismo našli objašnjenje za ovu pojavu, pretpostavili smo da ova dva blokatora dejodinaza mogu imati posredan uticaj na metabolizam selena (resorpciju, vezivanje ili ugradnju u odgovarajuće selenoproteine krvi, izlučivanje putem bubrega) preko tireoidne osovine, odnosno da promena parametara tireoidne osovine (T4 ili T3) ima uticaj na metabolizam selena. Naime, kod grupe tretirane sa PTU ustanovljena je hipotireoza (niže vrednosti i tiroksina i trijodtironina). Moguće je da je ovakav tireoidni status okidač za pokretanje bolje resorpcije selena i njegovog transporta do tkiva bitnih za proizvodnju navedenih hormona (štitaste žlezde i jetre), jer su dejodinaze, odgovorne za konverziju T4 u T3, upravo selenoenzimi.

Yoshida i Nakazono (1995), koriste i propiltiouracil kao sredstvo za izazivanje hipotireoizma kod pacova, proučavaju uticaj promenjene tireoidne osovine na status selena u jetri. Hrana deficitna u selenu je bila sa 0,01 mg Se/kg hrane što je 3 puta manje nego u našem eksperimentu, a aplikovana doza PTU je 0,05% (naspram naših 0,015%). Ovi autori su određivali količinu selena u jetri kao i aktivnost GPx1 jetre i nakon 6 nedelja eksperimenta su uočili povećanje koncentracije selena u jetri kod Se^+PTU^+ jedinica u odnosu na Se^+PTU^- jedinice. Kod nas je sličan efekat uočeno u krvi, ali 3 nedelje nakon početka tretmana primenom je selen određen u punoj krvi. Po Beilsteinu i Whangeru (1988) je 80,5% selena u eritrocitima ugrađeno u glutation

peroksidazu (GPx1), te smo otkrili promene i u aktivnosti ovog enzima. Međutim, nije zabeležena značajna veća aktivnost glutation peroksidaze u eritrocitima (GPx1) kod ovih jedinki (grupa $Se^{+}PTU^{+}IA^{-}$) pa se može zaključiti da selen nije bio ugrađivan u ovaj selenoprotein već je transportovan do drugih tkiva.

Ono što udi jeste pojava niske koncentracije selena u krvi ($269,5 \pm 85,1 \mu\text{g/L}$) selenadekvatnih jedinki koje su dobijale oba blokatora ($PTU^{+}IA^{+}$), iako su imale sličan profil tireoidnih hormona kao i jedinke tretirane samo sa PTU. Sličan efekat je zapažen i nakon sedam nedelja tretmana iako nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji selena između kontrolne grupe ($514,0 \pm 125,1 \mu\text{g/L}$) i grupe tretirane sa PTU i IA ($315,6 \pm 168,6 \mu\text{g/L}$). Prema Bermano i sar. (1995) i Bates i sar. (2000) aktivnost ID1 u štitastoj žlezdi se prilikom deficita selena povećava te je moguće da se usled preraspodele selena u tkivima, više selena zadržava u tireoideji i mozgu, (Yoshida i Nakazono, 1995), a samim tim ga ima manje u krvi. Na ovo upućuju i podaci vezani za nivo trijodtironina koji je u tom periodu (nakon sedam nedelja tretmana) kod svih selenadekvatnih jedinki bio približno isti iako je količina selena u krvi jedinki tretiranih blokatorima bila smanjena.

Vrednosti koncentracije selena u krvi nakon sedam nedelja su kod selenadekvatnih jedinki koje nisu bile tretirane sa propiltiouracilom niti sa IA iznosile u proseku $514,0 \pm 125,1 \mu\text{g/L}$ selena u krvi, što je u skladu sa navodima Hurta i sar. (1971). Koncentracije selena u krvi selendeficitnih jedinki su bile značajno niže ($84,2 \pm 44,4 \mu\text{g/L}$), a utvrđen stepen statističke značajnosti je na nivou $p < 0,001$.

U ostalim selendeficitnim (PTU^{+} i IA^{+}) oglednim grupama je zabeležena statistički značajno niža koncentracija selena u krvi u odnosu na kontrolnu grupu (grupa $Se^{-}PTU^{+}IA^{+}$ - $83,67 \pm 28,20 \mu\text{g/L}$; grupa $Se^{-}PTU^{+}IA^{-}$ - $94,20 \pm 41,54 \mu\text{g/L}$; grupa $Se^{-}PTU^{-}IA^{+}$ - $68,83 \pm 10,76 \mu\text{g/L}$).

6.6.2. Aktivnost citosolne glutation peroksidaze (GPx1)

Glutation peroksidaza 1 (GPx1) ima u odnosu na druge selenoproteine jedinstven način regulacije ekspresije. Naime, jedino aktivnost ovog selenoenzima u tolikoj meri zavisi od količine raspoloživog selena, pri čemu kod jedinki sa deficitom selena opada i količina iRNK u jetri za 90% (Saedi i sar., 1988), i aktivnost samog

enzima (Knight i Sunde, 1987). Weiss Sachdev i Sunde su 2001. godine uo ili da selen uti e na stabilnost iRNK glutacion peroksidaze 1 te da se u slu aju njegovog deficita javlja raspad informacione RNK. Ova dva autora predlažu postojanje „prekida a“ koji je zavisao od selena i da u slu aju deficita selena, iRNK citosolne glutacion peroksidaze podleže raspadu zbog prisustva STOP kodona (*nonsense-mediated decay*). Isti autori navode da se ovo ne dešava sa iRNK za GPx4. Prate i efikasnost translacije putem ugradnje selena u selenoprotein, uo ili su da se kod selenadekvatnih jedinki ona pove ava 17-24 puta u odnosu na jedinice sa deficitom selena. Kako navode autori, pove anje koli ine iRNK u kombinaciji sa pove anom efikasnoš u translacije kod selenadekvatnih jedinki moglo bi objasniti sto puta ve u aktivnost ovog enzima u odnosu na jedinice sa deficitom selena.

Kako pove anje koncentracije selena u hrani preko 0,1 µg selena/g ne uti e na regulaciju iRNK i aktivnosti GPx1 (Weiss i sar., 1996), odabrana koli ina selena u hrani za pacove u našem eksperimentu od 0,3 µg selena/g svakako je obezbedila punu aktivnost citosolne glutacion peroksidaze kod selenadekvatnih jedinki.

Whanger i Butler (1988) nakon šest nedelja eksperimenta na pacovima beleže aktivnost GPx1 eritrocita od 435±19 µkat/L kod selenadekvatnih jedinki (0,2 mg Se/kg hrane u obliku natrijum selenita). U našem eksperimentu, kod selenadekvatnih jedinki, aktivnost ovog enzima nakon tri nedelje tretmana iznosi 153,3±28,5 µkat/L, a nakon sedam nedelja je dva puta ve a i iznosi 342,1±103,3 µkat/L. Aktivnost glutacion peroksidaze eritrocita je kod selendeficitnih jedinki (0,02 mg Se/kg hrane) u eksperimentu navedenih autora za 90% niža u odnosu na selenadekvatne jedinice. Kod jedinki sa deficitom selena ($\text{Se}^{\text{PTU}^-}\text{IA}^-$) u našem eksperimentu, zabeležena aktivnost glutacion peroksidaze u krvi je, nakon tri nedelje, iznosila 73,65±17,67 µkat/L što je za 52% niža aktivnost u odnosu na kontrolnu grupu, a nakon sedam nedelja je na istom nivou kao i tre e nedelje, iznosi 88,6±23,9 µkat/L, što je za 74% niža vrednost u odnosu na selenadekvatne jedinice. Razlika u procentima se, kao i u slu aju GPx3, može objasniti upotrebom selendeficitne hrane sa ve om koli inom selena u odnosu na navedene autore.

Zabeležene prose ne aktivnosti GPx1 kod selenadekvatnih jedinki tretiranih sa jopanoi nom kiselinom ($\text{Se}^{\text{PTU}^+}\text{IA}^+$) i propiltiouracilom ($\text{Se}^{\text{PTU}^+}\text{IA}^-$) nakon 3 nedelje tretmana su iznosile 175,5±51,73 i 150,1±46,09 µkat/L i nije zabeležena statisti ki

zna ajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu ($\text{Se}^+\text{PTU}^-\text{IA}^-$). Istovremena aplikacija oba blokatora tako e nije imala zna ajan uticaj na aktivnost ovog enzima. Selendeficitne jedinke su imale statisti ki zna ajno niže aktivnosti GPx1 u odnosu na kontrolnu grupu, osim ogleadne grupe koja je istovremeno dobijala oba blokatora (i PTU i IA). Prose na aktivnost GPx1 u ovoj grupi ($\text{Se}^-\text{PTU}^+\text{IA}^+$) je iznosila $132,13 \pm 35,91$ $\mu\text{kat/L}$ i bila je statisti ki zna ajno viša u odnosu na aktivnost GPx1 kod selendeficitnih jedinki koje nisu dobijale blokatore. U dostupnoj literaturi nismo pronašli objašnjenje za ovu pojavu. Kako je kod tih jedinki ustanovljena hipotireoza, a kako je postojala i negativna korelaciona zavisnost sa koncentracijom T3 i T4 (Grafikon 5.11.1), prepostavili smo da je pad koncentracije tireoidnih hormona mogao uticati na pove anu sintezu ovog selenoproteina, odnosno da bi tireoidni hormoni mogli da imaju supresivno dejstvo na sintezu nekih selenoproteina te da pad njihove koncentracije dovodi do smanjenja supresije i da se posledi no tome pove ava njegova aktivnost.

Nakon sedam nedelja tretmana, prose na aktivnost GPx1 je bila ujedna ena u svim selenadekvatnim grupama. Kod selendeficitnih jedinki aktivnost ovog enzima je bila nekoliko puta niža. Selendeficitna grupa tretirana sa oba blokatora je imala nešto višu aktivnost ovog enzima u odnosu na ostale selendeficitne grupe, ali ova razlika nije bila statisti ki zna ajna.

6.6.3. Aktivnost plazmatske glutation peroksidaze (GPx3)

Izmerene aktivnosti plazmatske glutation peroksidaze (GPx3) su nakon tri nedelje eksperimenta kod selenadekvatnih jedinki ($\text{Se}^+\text{PTU}^-\text{IA}^-$) u proseku iznosile $55,27 \pm 17,85$ $\mu\text{kat/L}$, a kod jedinki sa deficitom selena ($\text{Se}^-\text{PTU}^-\text{IA}^-$) $32,08 \pm 14,87$ $\mu\text{kat/L}$, pri emu je izra unati pad aktivnosti ovog enzima u plazmi iznosio 42%. Hill i sar. (1987) navode da kod seledeficitnih jedinki brže opada aktivnost GPx1 nego GPx3 te su naši rezultati u skladu sa navedenim autorima pošto je u posmatranom periodu aktivnost GPx1 opala u ve em procentu (52%) nego aktivnost GPx3. Isti autori navode da je za maksimalni pad aktivnosti GPx3 prilikom deficita selena kod pacova potrebno 6 nedelja. Nakon sedam nedelja, aktivnost GPx3 je u kontrolnoj grupi bila $119,40 \pm 37,00$ $\mu\text{kat/L}$, a kod jedinki sa deficitom selena ($\text{Se}^-\text{PTU}^-\text{IA}^-$) je bila $23,48 \pm 4,32$ $\mu\text{kat/L}$ te možemo re i da je tokom vremena aktivnost GPx3 kod selenadekvatnih

jedinki porasla dva puta, a da je kod selendeficitnih jedinki stagnirala. Bates i sar. (2000) tako e navode da aktivnost GPx3 raste sa staroš u pacova, a sli ni rezultati su dobijeni i kod nekih drugih životinjskih vrsta: goveda (Jovanovi i sar., 2004.), pili a (Val i i sar., 2011.). Hill i sar. (1987) su za izazivanje deficita selena koristili hranu sa 0,008 mg Se/kg hrane, a zabeleženi pad aktivnosti GPx3 je bio 99%. U našem eksperimentu je nakon tri nedelje aktivnost GPx3 pala za 42% kod selendeficitnih jedinki u odnosu na selenadekvatne. Pad aktivnosti ovog enzima nakon 7 nedelja tretmana od 78,64% u našem eksperimentu može se objasniti upotrebom selendeficitne hrane sa ve om koli inom selena (0,03 mg Se/kg hrane) u odnosu na navedene autore.

Prilikom upotrebe propiltiouracila (grupa $\text{Se}^+\text{PTU}^+\text{IA}^-$), nakon tri nedelje je zabeležena statisti ki zna ajno ve a aktivnost GPx3 u odnosu na kontrolnu grupu i ona je u proseku iznosila $91,38 \pm 20,42 \mu\text{kat/L}$. Kako je u istoj grupi izmerena i ve a koncentracija selena u krvi mogu e je da je ovo uzrok pove anja aktivnosti GPx3.

Nakon sedam nedelja tretmana aktivnost GPx3 je u svim selenadekvatnim grupama bila ujedna ena dok je kod svih selendeficitnih jedinki zabeležena statisti ki zna ajno niža aktivnost GPx3. Selendeficitne grupe tretirane sa PTU su imale nešto više aktivnosti GPx3 u odnosu na ostale selendeficitne grupe, a t-testom je zabeležena statisti ka zna ajnost. U istim grupama je zabeležena i dramati no niža koncentracija T3 i T4. Nakon obrade podataka, utv ena je negativna korelaciona zavisnost izme u nivoa tireoidnih hormona i aktivnosti ovog enzima i to samo kod selendeficitnih jedinki. Pojava negativne korelacione zavisnosti izme u T3 i aktivnosti GPx3 i T4 i aktivnosti GPx3 mogla bi biti posledica prioriteta sinteze odre enih selenoproteina pri deficitu selena, koji se ostvaruje preko supresivnog dejstva tireoidnih hormona na sintezu ovih selenoproteina. Howie i sar. (1995) navode da kada opada proizvodnja tireoidnih hormona u štitastoj žlezdi, raste sekrecija GPx3.

6.7. Korelacije

6.7.1. Korelaciona zavisnost izme u koncentracije selena i aktivnosti GPx1 i GPx3

Nakon analize korelacione zavisnosti izme u koncentracije selena u krvi i aktivnosti GPx1 eritrocita, nakon tri nedelje tretmana, utvrđeni koeficijent korelacije je iznosio 0,66 ($p < 0,01$), a uzete su u obzir vrednosti za ova dva parametra kod svih ispivanih jedinki. Izvode i korelacionu zavisnost pojedina no po tretmanima, uo ena je visoka korelaciona zavisnost izme u ova dva parametra kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki $r = 0,81$. Kod drugih životinjskih vrsta vrednosti koeficijenta korelacije se kre u od $r = 0,78$ kod ovaca (Pešut, 1996), $r = 0,59$ kod goveda, $r = 0,27$ kod svinja (McMurray i Blanchflower, 1976). Aplikacija blokatora dejodinaza pojedina no, u ovom periodu, nije bitno uticala na vrednosti koeficijenta korelacije koji su iznosili $r = 0,83$ kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki tretiranih sa PTU i $r = 0,78$ kod selenadekvatnih i selendeficitnih jedinki tretiranih sa IA. Yoshida i Nakazono (1995), pri primeni PTU, tako e ne uo avaju narušavanje korelacione zavisnosti izme u koli ine selena i aktivnosti GPx1 u jetri. Me utim, istovremeni tretman sa oba blokatora (PTU i IA) je doveo do gubitka korelacione zavisnosti izme u ova dva parametra. Kod ovih selenadekvatnih jedinki nižu koncentraciju selena u krvi nije pratila niža aktivnost GPx1, a selendeficitne jedinke su imale višu aktivnost ovog enzima u odnosu na selendeficitne jedinke koje nisu dobijale blokatore. Narušavanje korelacije kod ovih jedinki moglo bi biti posledica preusmeravanja selena u sintezu GPx u uslovima hipotireoze. Ista pojava je zapažena i kod korelacione zavisnosti izme u koncentracije selena u krvi i aktivnosti GPx3 nakon sedam nedelja kada je tretman sa oba blokatora (PTU i IA) ili samo sa PTU, doveo do gubitka korelacione zavisnosti izme u selena i GPx3. Posmatraju i oba ova tretmana zajedno (sve jedinke tretirane sa PTU), koeficijent korelacije je iznosio $r = 0,55$ (Grafikon 5.10.4.) i bio je zna ajno manji od koeficijenta korelacije kod jedinki netretiranih sa PTU kod kojih je iznosio $r = 0,94$ (Grafikon 5.10.3.). U selenadekvatnim grupama tretiranim sa PTU, nivo selena u krvi je bio niži u odnosu na kontrolnu grupu i grupu tretiranu sa IA, pri emu su aktivnosti GPx3 bile ujedna ene. Kod selendeficitnih jedinki, aktivnost GPx3 je kod jedinki tretiranih sa PTU bila zna ajno viša u odnosu na selendeficitne jedinke koje nisu

dobijale PTU (Grafikon 5.8.2). Zaključak bi mogao biti isti, a to je da se u uslovima hipotireoze, selen usmerava u sintezu GPx.

6.7.2. Korelaciona zavisnost između koncentracije tireoidnih hormona i aktivnosti GPx1 i GPx3

Nakon tri nedelje tretmana je uočena negativna korelaciona zavisnost između T3 i aktivnosti glutacione peroksidaze 1 kod selendeficitnih jedinki (Grafikon 5.11.1). Isti efekat je zapažen i kod korelacione zavisnosti između T3 i GPx3, nakon sedam nedelja tretmana, kada je uočena negativna korelacija između ova dva parametra kod selendeficitnih jedinki.

Zabeležene promene aktivnosti glutacione peroksidaze i negativna korelaciona zavisnost između aktivnosti GPx i koncentracije tireoidnih hormona, mogle bi ukazati na inhibitorski uticaj tireoidnih hormona na ekspresiju i/ili aktivnost glutacione peroksidaze u odnosu na raspoloživi selen, u uslovima hipotireoze izazvane sistemskim padom koncentracije T4. Ovaj efekat je naročito izražen kod selendeficitnih životinja. U opisanim uslovima potrebna je povišena konverzija T4 u T3 kako bi se održala fiziološka koncentracija aktivnog hormona T3, pa se raspoloživi selen preusmerava od sinteze peroksidaza ka sintezi dejodinaze, pre svega ID2.

7. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Telesna masa juvenilnih pacova značajno se smanjivala tokom celog eksperimentalnog perioda usled blokade tireoidne osovine propiltiouracilom (PTU), i kao posledica niskog statusa selena. Najveće smanjenje telesne mase je uočeno kod selendeficitnih jedinki tretiranih sa (PTU).
2. Koncentracija tiroksina (T4) u krvnoj plazmi juvenilnih pacova je sve vreme značajno opadala u eksperimentalnim grupama tretiranim sa PTU. Kod selendeficitnih životinja ovaj pad je bio izrazitiji u odnosu na selenadekvatne jedinke.
3. Koncentracija trijodtironina (T3) u krvnoj plazmi juvenilnih pacova opala je posle tri nedelje u svim grupama tretiranim sa PTU, bez obzira na status selena. Posle sedam nedelja tretmana, koncentracija T3 se ujednačila na normalnom nivou kod selenadekvatnih pacova, dok su vrednosti ostale niže kod selendeficitnih pacova tretiranih sa PTU.
4. Koncentracija tireostimulirajućeg hormona (TSH) u krvnoj plazmi pacova višestruko je porasla u svim grupama tretiranim sa PTU tokom celog eksperimentalnog perioda. Istovremeno, koncentracija TSH je blago porasla kod životinja tretiranih jopanojnom kiselinom (IA). I kod selendeficitnih jedinki je tokom eksperimenta ustanovljena blago povišena koncentracija TSH.
5. Procenat konverzije T4 u T3 rastao je celim tokom eksperimenta kod grupa pacova tretiranih sa PTU, da bi kod selendeficitnih životinja posle sedam nedelja dostigao vrednosti bliske stopostotnoj aktivaciji.
6. Koncentracija selena u punoj krvi juvenilnih pacova bila je višestruko (5-7 puta) niža kod svih selendeficitnih grupa u poređenju sa selenadekvatnim. Kod selenadekvatnih životinja blokada tireoidne osovine izazvana sa PTU+IA dovela je do značajnog smanjenja koncentracije selena u odnosu na kontrolu.
7. Aktivnost selenoenzima glutathion peroksidaze 1 (GPx1) eritrocita i glutathion peroksidaze 3 (GPx3) u krvnoj plazmi je kod selenadekvatnih jedinki porasla 2 – 2,5 puta u sedmoj u odnosu na treću u nedelju eksperimenta, dok kod selendeficitnih pacova porast tokom vremena nije zabeležen. Kod selendeficitnih grupa

istovremeno tretiranih sa PTU+IA aktivnost GPx1 bila je viša u pore enju sa selendeficitnom grupom netretiranom blokatorima dejodinaza nakon tri nedelje, a selendeficitne grupe tretirane sa PTU su imale dvostruko višu aktivnost GPx3 u odnosu na selendeficitnu grupu netretiranu blokatorima dejodinaza nakon sedam nedelja.

8. Visoka pozitivna korelaciona zavisnost utvr ena je izme u koncentracije selena u krvi i aktivnosti selenoenzima GPx1 i GPx3 tokom celokupnog trajanja eksperimenta u svim oglednim grupama zajedno. Me utim, korelaciona zavisnost bila je raskinuta za GPx1 posle tri nedelje u grupama tretiranim sa PTU+IA, kao i za GPx3 u sedmoj nedelji kod životinja tretiranih sa PTU.
9. Negativna korelaciona zavisnost ($r=-0,55$, $p<0,01$) utvr ena je izme u koncentracije T3 u krvnoj plazmi i aktivnosti eritrocitne GPx1 u tre oj nedelji eksperimenta na nivou celokupne selendeficitne populacije; negativna korelacija ($r=-0,63$, $p<0,01$) utvr ena je izme u nivoa T3 i aktivnosti GPx3 u krvnoj plazmi selendeficitnih pacova u sedmoj nedelji eksperimenta.

8. Spisak literature

1. Andersson M, Holmgren A, Spyrou G, 1996, NK-lysin, a disulfide- containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase: implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity, *J Biol Chem*, 271, 10116–10120.
2. Anundi I, Hogberg J, Stahl A, 1984, Absorption of selenite in the rat small intestine: interactions with glutathione, *Acta Pharmacol Toxicol*, 54, 273.
3. Arner ES, 2009, Focus on mammalian thioredoxin reductases- Important selenoproteins with versatile functions, *Biochim Biophys Acta*, 1790, 495-526.
4. Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ, 1990, Hepatic iodothyronine 5' deiodinase. The role of selenium, *Biochem J*, 272, 537-540.
5. Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ, 2003, Selenium in the immune system, *J Nutr*, 133, 1457S-9S.
6. Baqui MM, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC, 2000, Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy, *Endocrinology* 141, 4309–4312.
7. Barnes KM, Evenson JK, Raines AM, Sunde RA, 2009, Transcript analysis of the selenoproteome indicates that dietary selenium requirements of rats based on selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity¹⁻³, *J Nutr*, 139, 199-206.
8. Bates JM, Spate VL, Morris JS, St. Germain DL, Galton VA, 2000, Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development, *Endocrinology*, 141, 2490–2500.
9. Beck MA, Esworthy RS, Ho YS, Chu FF, 1998, Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis, *FASEB J* 12, 1143–1149.
10. Beckett GJ, Arthur JR, Miller SM, McKenzie RC, 2004, Minerals and Immune responses-selenium, *Diet and Human Immune Function*, pp 217-240, Eds da Hughes, LG Darlington, A Bendich, WR Beisel, Totowa, NJ: Humana Press.
11. Beckett GJ, MacDougal DA, Nicol F, Arthur JR, 1989, Inhibition of type I and II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency, *Biochem J*, 259, 887–89.
12. Beckett GJ, Nicol F, Rae P, Beech S, Guo Y, Arthur JR, 1993, Effects of combined iodine and selenium deficiency on thyroid hormone metabolism in rats, *Am J Clin Nutr Suppl*, 57, 240-243.
13. Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J, 1990, Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme, *Biochem Biophys Res Commun*, 31, 173(3), 1143-9.

14. Beilstein MA, Vendeland SC, Barofsky E, Jensen ON, Whanger PD, 1996, Selenoprotein W of rat muscle binds glutathione and an unknown small molecular weight moiety, *J Inorg Biochem*, 61, 117– 124.
15. Beilstein MA, Whanger PD, 1988, Glutathione peroxidase activity and chemical forms of selenium in tissues of rats given selenite or selenomethionine, *J Inorgan Biochem*, 33, 31-46.
16. Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE, 1995, Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats, *Biochem J*, 15,311, 425-30.
17. Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR, 1991, Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region, *Nature*, 353, 273-276.
18. Berry MJ, Kates AL, Larsen PR, 1990, Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver, *Mol Endocrinol*, 4, 743–748.
19. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR, 2002, Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases, *Endocr Rev*, 23, 38-89.
20. Bianco AC, Silva JE, 1987, Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T₃) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T₃ as determined by *in vivo* techniques, *Endocrinology*, 120, 55–62.
21. Biterova EI, Turanov AA, Gladyshev VN, Barycki JJ, 2005, Crystal structures of oxidized and reduced mitochondrial thioredoxin reductase provide molecular details of the reaction mechanism, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15018–15023.
22. Björnstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A, 1994, The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase, *J Biol Chem*, 25, 269(47), 29382-4.
23. Björnstedt M, Hamberg M, Kumar S, Xue J, Holmgren A, 1995, Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols, *J Biol Chem*, 270, 11761–11764.
24. Björnstedt M, Kumar S, Holmgren A, 1992, Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase, *J Biol Chem*, 25, 267(12), 8030-4.
25. Blondeau JP, Beslin A, Chantoux F et al, 1993, Triiodothyronine is a high affinity inhibitor of amino acid transport system LI in cultured astrocytes, *Journal of Neurochemistry*, 60, 1407-1413.
26. Braga M, Cooper D, 2001, Oral cholecystographic agent and the thyroid, *J Clin Endocrin*, 86, 1853-1860.
27. Brigelius-Flohe R, 1999, Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases, *Free Radic Biol Med* 27, 951–965.

28. Brigelius-Flohe R, Banning A, 2006, Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signaling and gene regulation: sulforaphane and selenium, partners in adaptive response and prevention of cancer, *Free Radic Res*, 40, 775-787.
29. Budiman ME, Bubenik J., Miniard AC, Middleton LM, Gerber CA, Cash A, Driscoll DM, 2009, Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation, *Mol Cell*, 35, 479-489.
30. Buettner C, Harney JW, Larsen PR, 1999, The 3'-untranslated region of human type 2 iodothyronine deiodinase mRNA contains a functional selenocysteine insertion sequence element, *J Biol Chem*, 273 (50), 33374-8.
31. Bürki H, Wimpfheimer A, Burger W, Zaunbauer H, Rösler, Lemachand, 1976, Changes of circulating thyroxine, triiodothyronine and reverse triiodothyronine after radiographic contrast agents, *J Clin Endocrin*, 43, 1203-1210.
32. Burk RF, Nishiki K, Lawrence RA, Chance B, 1978, Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free purified rat liver, *J Biol Chem*, 253, 43-46.
33. Burk RF, Hill KE, 1994, Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein, *J Nutr*, 124, 1891-1897.
34. Burk RF, Hill KE, 2005, Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis, *Annu Rev Nutr* 25, 215-235.
35. Burmeister LA, Pachucki J, St. Germain DL, 1997, Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms, *Endocrinology*, 138, 5231-5237.
36. Campos-Barros A, Hoell T, Musa A, Sampaolo S, Stoltenburg G, Pinna G, Eravci M, Meinhold H, Baumgartner A, 1996, Phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodination and thyroid hormone concentrations in the human central nervous system, *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2179-2185.
37. Canettieri G, Celi FS, Baccheschi G, Salvatori L, Andreoli M, Centanni M, 2000, Isolation of human type 2 deiodinase gene promoter and characterization of a functional cyclic adenosine monophosphate response element, *Endocrinology*, 141, 1804-1813.
38. Carlson BA, Xu XM, Gladyshev VN, Hatfield DL, 2005, Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA, *J Biol Chem*, 280, 5542-5548.
39. Cettour-Rose P, Visser TJ, Burger AG, Rohner-Jeanrenaud F, 2005, Inhibition of pituitary type 2 deiodinase by reverse triiodothyronine does not alter thyroxine-induced inhibition of thyrotropin secretion in hypothyroid rats, *European Journal of Endocrinology*, 153, 429-434.
40. Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR, 1986, The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in

- the active site is encoded by the termination codon, TGA, EMBO J, 5, 1221-1227.
41. Chanoine JP, Braverman LE, Farwell AP, Safran M, Alex S, Dubord S, Leonard JL, 1993, The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat, J Clin Invest, 91, 2709–2713.
 42. Chanoine JP, Safran M, Farwell AP, Dubord S, Alex S, Stone S, Arthur JR, Braverman LE, Leonard JL, 1992, Effects of selenium deficiency on thyroid hormone economy in rats, Endocrinology, 131, 1787–1792.
 43. Chavatte L, Brown BA, Driscoll DM, 2005, Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recording machinery in eukaryotes, Nat Struct Mol Biol, 12, 408-416.
 44. Cheng W, Fu YX, Porres JM, Ross DA, Lei XG, 1999, Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids and protein, FASEB J 13, 1467–1475.
 45. Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF Jr, Lei XG, 1998, Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice, J Nutr, 128, 1070–1076.
 46. Cheng WH, Quimby FW, Lei XG, 2003, Impacts of glutathione peroxidase- 1 knockout on the protection by injected selenium against the pro-oxidant-induced liver aponecrosis and signaling in selenium- deficient mice, Free Radic Biol Med, 34, 918–927.
 47. Cheron RG, Kaplan MM, Larsen PR, 1979, Physiological and pharmacological influences on thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion and nuclear 3,5,3'-triiodothyronine binding in rat anterior pituitary, J Clin Invest, 64, 1402–1414.
 48. Cho YM, Bae SH, Choi BK, Cho SY, Song CW, Yoo JK, Paik YK, 2003, Differential expression of the liver proteome in senescence accelerated mice, Proteomics, 3, 1883-1894 .
 49. Chopra IJ, 1977, A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T₄) to 3,3',5-triiodothyronine (T₃) *in vitro*. Endocrinology, 101, 453–463.
 50. Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, Doroshov JH, Aranda R, Martin MG, Binder SW, 2004, Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes, mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis, Cancer Res 64, 962–968.
 51. Chunxiang Wu, Xinli Gu, Yuxiang Wu, Jundong Wang, 2008, Effect of fluoride and arseni on serum thyroid hormone in rats, J Herbal Med Tox 2, 39-43.
 52. Combs and Lu, 2001, Selenium as a cancer preventative agent, In Selenium, Its Molecular Biology and Role in Human Health, pp 205-219, Ed DL Hatfield. Boston Kluwer Academic Publishers.
 53. Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kolle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW, 2005, The nuclear form of phospholipid

- hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability, *Mol Cell Biol*, 25, 7637–7644.
54. Contempre B, Duale NL, Dumont JE, Ngo B, Diplock AT, Vanderpas J, 1992, Effect of selenium supplementation on thyroid hormone metabolism in an iodine and selenium deficient population, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 36, 579–583.
 55. Copeland PR, Fletcher JE, Carlson BA, Hatfield DL, Driscoll DM, 2000, A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs, *EMBO J*, 19, 306-314.
 56. Copeland PR, Stepanik VA, Driscoll DM, 2001, Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec sequence binding protein 2, *Mol Cell Biol*, 21, 1491-1498.
 57. Courtin F, Pelletier G, Walker P, 1985, Subcellular localization of thyroxine 5'-deiodinase activity in bovine anterior pituitary, *Endocrinology*, 107, 1376-1383.
 58. Crantz FR, Larsen PR, 1980, Rapid thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion and nuclear 3,5,3'-triiodothyronine binding in rat cerebral cortex and cerebellum, *J Clin Invest*, 65, 935–938.
 59. Crantz FR, Silva JE, Larsen PR, 1982, An analysis of the sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat cerebral cortex and cerebellum, *Endocrinology*, 110, 367–375.
 60. Dai G, Levy O, Amzel LM et al, 1996, Cloning and characterization thyroid iodide transporter, *Nature*, 379, 458-460.
 61. de Jesus LA, Hoffman PR, Michaud T, Forry EP, Small-Howard A, Stillwell RJ, Morozova N, Harney JW, Berry MJ, 2006, Nuclear assembly of UGA decoding complexes on selenoprotein mRNA: a mechanism for eluding nonsense-mediated decay?, *Mol Cell Biol*, 26, 1795-1805.
 62. de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I, 1998, Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide, *J Biol Chem*, 273(35), 22528-36.
 63. Demelash A, Karlsson JO, Nilsson M, Björkman U, 2004, Selenium has a protective role in caspase-3-dependent apoptosis induced by H₂O₂ in primary cultured pig thyrocytes, *Eur J Endocrinol*, 150, 841-849.
 64. DePalo D, Kinlaw WB, Zhao C, Engelberg-Kulka H, St. Germain DL, 1994, Effect of selenium deficiency on type I 5'-deiodinase, *J Biol Chem*, 269, 16223–16228.
 65. Dickson RC, Tomlison RH, 1967, Selenium in blood and human tissues, *Clinica Chimica Acta*, 16, 311-321.
 66. Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, Gladyshev VN, 2007, SelT, SelW, SelH, and Rdx12: Genomics and Molecular Insights into the Functions of

- Selenoproteins of a Novel Thioredoxin-like Family, *Biochemistry*, 46, 6871–6882.
67. Dumitrescu M, Liao H, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE, Reffetof S, 2005, Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism, *Nat Genet*, 37, 1247-1252.
 68. Ekholm R, Björkman U, 1997, Glutathione peroxidase degrades intracellular hydrogen peroxide and thereby inhibits intracellular protein iodination in thyroid epithelium, *Endocrinology*, 138, 2871-2878.
 69. Emerson CH, Bambini G, Alex S, Castro MI, Roti E, Braverman LE, 1988, The effect of thyroid dysfunction and fasting on placenta inner ring deiodinase activity in the rat, *Endocrinology*, 122, 809–816.
 70. Engler H, Taurog A, Luthy C, Dorris ML, 1983, Reversible and irreversible inhibition of thyroid peroxidase-catalyzed iodination by thioureyne drugs, *Endocrinology*, 112, 86.
 71. Esfandiari A, Courtin F, Lennon AM, Gavaret JM, Pierre M, 1992, Induction of type III deiodinase activity in astroglial cells by thyroid hormones, *Endocrinology*, 131, 1682–1688.
 72. Esworthy RS, Aranda R, Martin MG, Doroshow JH, Binder SW, Chu FF, 2001, Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G848–G855.
 73. Esworthy RS, Yang L, Frankel PH, Chu FF, Aranda R, Martin MG, Doroshow JH, Binder SW, 2005, Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice: mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis, *J Nutr* 135, 740–745.
 74. Fagegaltier D, Hubert N, Yamada K, Mizutani T, Carbon P, Krol A, 2000, Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation, *EMBO J*, 19, 4796-4805.
 75. Ferguson AD, Labunskyy VM, Fomenko DE, Arac D, Chelliah Y, Amezcua CA, Rizo J, Gladyshev VN, Deisenhofer J, 2006, NMR structures of the selenoproteins Sep15 and SelM reveal redox activity of a new thioredoxin-like family, *J Biol Chem*, 281, 3536–3543.
 76. Fletcher JE, Copeland PR, Driscoll DM, Krol A, 2001, The selenocysteine incorporation machinery: interactions between the SECIS RNA and the SECIS-binding protein SBP2, *RNA*, 7, 1442-1453.
 77. Flohe L, Gunzler WA, Schock HH, 1973, Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 32: 132–134.
 78. Florian S, Wingler K, Schmehl K, Jacobasch G, Kreuzer OJ, Meyerhof W, Brigelius-Flohe R, 2001, Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in a normal and malignant human intestinal tissue, *Free Radic Res*, 35, 655-663.
 79. Fomenko DE, Novoselov SV, Natarajan SK, Lee BC, Koc A, Carlson BA, Lee TH, Kim HY, Hatfield DL, Gladyshev VN, 2008, Methionine-R-sulfoxide

- reductase 1 (MsrB1) knockout Mmice: Roles of MsrB1 in redox regulation and identification of a novel selenoprotein form, *J Biol Chem*, 284, 5986–5993.
80. Foresta C, Flohe L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M, 2002, Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biol Reprod*, 67, 967–971.
 81. Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL, 1978, Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine, *Biochemistry*, 17, 2639–2644.
 82. Freedman JE, Loscalzo J, Benoit SE, Valeri CR, Barnard MR, Michelson AD, 1996, Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis, *J Clin Invest*, 97, 979–987.
 83. Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ, 1999, Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun*, 254, 497–501.
 84. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ, 2003, Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278:40128–40135.
 85. Friesema EC, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MH, Visser TJ, 2008, Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol Endocrinol* 22:1357–1369.
 86. Frumess RD, Larsen PR, 1975, Correlation of serum triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) with biologic effects of thyroid hormone replacement in propylthiouracil-treated rats, *Metabolism*, 24, 547–554.
 87. Galton VA, Martinez E, Hernandez A, St. Germain EA, Bates JM, St. Germain DL, 2001, The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and induced during pregnancy, *Endocrinology*, 142, 2123–2128.
 88. Ganther HE. 1999, Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase, *Carcinogenesis*, 20, 1657–1666.
 89. Gao Y, Feng HC, Walder K, Bolton K, Sunderland T, Bishara N, Quick M, Kantham L, Collier GR, 2004, Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein, *FEBS Lett*, 563, 185–190.
 90. Gao Y, Pagnon J, Feng HC, Konstantopolous N, Jowett JB, Walder K, Collier GR, 2007, Secretion of the glucose-regulated selenoprotein SEPS1 from hepatoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 356, 636–641.
 91. Gasiewicz TA, Smith JC, 1976, Interaction of cadmium and selenium in rat plasma in vivo and in vitro, *Biochim Biophys Acta*, 428, 113.
 92. Gereben B, Goncalves C, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC, 2000, Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation, *Mol Endocrinol*, 14, 1697-708.

93. Gereben B, Salvatore D, Harney JW, Tu HM, Larsen PR, 2001, The human, but not rat, *dio2* gene is stimulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1), *Mol Endocrinol*, 15, 112–124.
94. Germain DL, 1985, Metabolic effect of 3,3',5'-triiodothyronine in cultured growth hormone-producing rat pituitary tumor cells. Evidence for a unique mechanism of thyroid hormone action, *J Clin Invest*, 76, 890–893.
95. Germain DL, 1988a, The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thiol-disulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase, *Endocrinology*, 122, 1860–1868.
96. Germain DL, 1988b, Dual Mechanisms of Regulation of Type I Iodothyronine 5'-Deiodinase in the Rat Kidney, Liver, and Thyroid Gland Implications for the Treatment of Hyperthyroidism with Radiographic Contrast Agents, *J Clin Invest*, 81, 1476-1484.
97. Giometti, CS, Liang X, Tolladsen SI, Wall DB, Lubman DM, Subbarao V, Rao MS, 2000, Mous liver seleniun-binding protein decreased in abundance by peroxisome proliferators, *Electrophoresis*, 21, 2162-2169.
98. Glass R, Singh W, Jung, W, Veres Z, Scholz T, Stadtman T, 1993, Monoselenophosphate: Synthesis, characterization and identity with the procariotic biological selenium donor, compound SePX, *Biochemistry*, 12555-12559.
99. Gondou A, Toyoda N, Nishikawa M, Yonemoto T, Sakaguchi N, Tokoro T, Inada M, 1999, Effect of nicotine on type 2 deiodinase activity in cultured rat glial cells, *Endocr J*, 46, 107–112.
100. Gross J, Pitt-Riveers R, 1951, Unidentified iodine compounds in human plasma in addition to thyroxine and iodide, *Lancet* 2, 766-769.
101. Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guerineau NC, Elkahloun AG, Fournier A, Vieau D, Vaudry H, Anouar Y, 2008, Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion, *FASEB J*, 22, 1756–1768.
102. Gu QP, Sun Y, Ream LW, Whanger PD, 2000, Selenoprotein W accumulates primarily in primate skeletal muscle, heart, brain and tongue, *Mol Cell Biochem*, 204, 49–56.
103. Guadano-Ferraz A, Obregon MJ, St. Germain DL, Bernal J, 1997, The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain, *Proc Natl Acad Sci, USA* 94, 10391–10396.
104. Guimaraes, MJ, Peterson D, Vicari A, Cocks BG, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ferrick DA, Kastelein RA, Bazan JF, Zlotnik A, 1996, Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: Is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 15086–15091.

105. Günzler WA, Steffens GJ, Grossman A, Kim SMA, Otting F, Wendel A, Flohe L, 1974, The amino acid sequence of a bovine glutathione peroxidase, Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem, 365, 195.
106. Habeos IG, Ziros PG, Chartoumpakis D, Psyrogiannis A, Kyriazopoulou V, Papavassiliou AG, 2008, Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver, J Mol Med, 86, 1279-85.
107. Hadley KB, Sunde RA, 2001, Selenium regulation of thioredoxin reductase activity and mRNA levels in rat liver, J Nutr Biochem 12, 693-702.
108. Halperin Y, Shapiro LE, Surks MI, 1994, Down-regulation of type II L-thyroxine, 5'-monodeiodinase in cultured GC cells: different pathways of regulation by L-triiodothyronine and 3,3',5'-triiodo-L-thyronine, Endocrinology, 135, 1464-1469.
109. Hansel A, Heinemann SH, Hoshi T, 2005, Heterogeneity and function of mammalian MSRs: enzymes for repair, protection and regulation, Biochim Biophys Acta, 1703, 239-247.
110. Harris ARC, Fang SL, Vagenakis AG, Braverman LE, 1978, Effect of starvation, nutrient replacement, and hypothyroidism on *in vitro* hepatic T₄ to T₃ conversion in the rat, Metabolism, 27, 1680-1690.
111. Hatfield DL, 2001, Selenium: Its molecular biology and role in human health, Kluwer academic publishers.
112. Hennemann G, Docter R, Friesema ECH, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ, 2001, Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability, Endocr Rev, 22, 451-476.
113. Hill K, Burk R, Lane J, 1987, Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione dependent enzymes in rat, J Nutr, 117, 99-104.
114. Hill KE, McCollum WG, Boeglin ME, Burk RF, 1997, Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency, Biochem Biophys Acta, 234, 293-295.
115. Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF, 2003, Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse, J Biol Chem, 278, 13640-13646.
116. Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD, 1997, Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia, J Biol Chem, 272, 16644-16651.
117. Hoffmann PR, Hoge SC, Li PA, Hoffman FV, Hashimoto AC, Berry MJ, 2007, The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply, Nucleic Acids Res, 35, 3963-3973.
118. Holmgren A, Lyckeberg C, 1980, Enzymatic reduction of alloxan by thioredoxin and NADPH-thioredoxin reductase, Proc Natl Acad Sci USA, 77, 5149-5152.

119. Holmgren A, Thioredoxin and glutaredoxin systems, 1989, *J Biol Chem* 264: 13963–13966.
120. Hood A, Liu YP, Gattone V, Klaassen C, 1999, Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rat treated with antithyroid drugs, *Toxicological sciences*, 49, 263-271.
121. Horibata Y, Hirabayashi Y, 2007, Identification and characterization of human ethanolamine phosphotransferase 1, *J Lipid Res*, 48, 503–508.
122. Hough CD, Cho KR, Zonderman AB, Schwartz DR, Morin PJ, 2001, Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer, *Cancer Res*, 61, 3869–3876.
123. Howie AF, Walker SW, Akesson B, Arthur JR, Beckett GJ, 1995, Thyroidal extracellular glutathione peroxidase: a potential regulator of thyroid-hormone synthesis, *Biochem J* 15, 713-717.
124. Huang SA, Tu HM, Harney JW, Venihaki M, Butte AJ, Kozakewich HP, Fishman SJ, Larsen PR, 2000, Severe hypothyroidism caused by type 3 iodothyronine deiodinase in infantile hemangiomas, *N Engl J Med*, 343, 185–189.
125. Huang TS, Chopra IJ, Beredo A, Solomon DH, Chua Teco GN, 1985, Skin is an active site for the inner ring monodeiodination of thyroxine to 3,3',5'-triiodothyronine, *Endocrinology* 117, 2106–2113.
126. Hurt HD, Cary EE, Visek WJ, 1971, Growth, reproduction and tissue concentration of selenium in the selenium depleted rat, *J Nutr*, 101, 761-766.
127. Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka M, Hanaoka K, Nakagawa Y, 2003, Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene, *Biochem Biophys Res Commun*, 305, 278–286.
128. Imai H, Nakagawa Y, 2003, Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, *Free Radic Biol Med*, 34, 145–169.
129. Imai Y, Toyoda N, Maeda A, Kadobayashi T, Wang F, Kuma K, Mitsushige N, Iwasaka T, 2001, Type 2 iodothyronine deiodinase expression is upregulated by protein kinase A-dependent pathway and is downregulated by the protein kinase C-dependent pathway in cultured human thyroid cells, *Thyroid*, 11, 899–907.
130. Itoh Y, Chiba S, Sekine S, Yokoyama S, 2009, Crystal structure of human selenocysteine tRNA, *Nucleic Acids Research*, Vol. 37, No. 18 6259-6268.
131. Jakobs TC, Schmutzler C, Meissner J, Kohrle J, 1997, The promoter of the human type I 5'-deiodinase gene-mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid-hormone- responsive element, *Eur J Biochem*, 247, 288–297.
132. Jameson RR, Carlson BA, Butz M, Esser K, Hatfield DL, Diamond AM, 2002, Selenium influences the turnover on selenocysteine tRNA in Chinese hamster ovary cells, *J Nutr*, 132, 1830-1835.

133. Jameson RR, Diamond AM, 2004, A regulatory role for Sec tRNA in selenoprotein synthesis, *RNA*, 10, 1142-1152.
134. Jeffrey E, Berry Marla, 2008, Eukaryotic selenoprotein synthesis: mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors, *Life*, 60, 232-235.
135. Jenkins KJ, Hidioglou M, 1972, Comparative metabolism of ⁷⁵Se-selenite, ⁷⁵Se-selenate and ⁷⁵Se-selenomethionine in bovine erythrocytes, *Can J Physiol Pharmacol*, 50, 972.
136. Jovanovi I, Pešut O, Gvozdi D, Stoji V, 2004, Selenium and iodine status relationship in calves and heifers from selenium and iodine deficient areas in Serbia, *Acta Veterinaria*, 54, 3-11.
137. Kaminsky SM, Levy O, Salvador C, Dai G, Carrasco N, 1994, Na⁺-IL symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-1--transporting cultured thyroid cells, *Proc Nati Acad Sci USA*, 91, 3789-3793.
138. Kamiya Y, Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M, 1999, Pretranslational regulation of rhythmic type II iodothyronine deiodinase expression by β-adrenergic mechanism in the rat pineal gland, *Endocrinology*, 140, 1272–1278.
139. Kaplan MM, Utiger RD, 1978, Iodothyronine metabolism in liver and kidney homogenates from hypothyroid and hyperthyroid rats, *Endocrinology*, 103, 156–161.
140. Kaplan MM, Yaskoski KA, 1980, Phenolic and tyrosyl ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates, *J Clin Invest*, 66, 551–552.
141. Kaplan MM, Yaskoski KA, 1981, Maturational patterns of iodothyronine phenolic tyrosyl ring deiodinase activities in rat cerebrum, cerebellum and hypothalamus, *J Clin Invest*, 67, 1208–1214.
142. Kim SW, Harney JW, Larsen PR, 1998, Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, *Endocrinology*, 139, 4895–4905.
143. Kimura T, Okajima F, Sho K, Kobayashi I, Kondo Y, 1995, Thyrotropin-induced hydrogen peroxide production in FRTL-5 thyroid cells is mediated not by adenosine 3',5'-monophosphate, but by Ca²⁺ signaling followed by phospholipase-A2 activation and potentiated by an adenosine derivative, *Endocrinology*, 136, 116-23.
144. Knight SA, Sunde RA, 1987, The effect of progressive selenium deficiency on anti-glutathione peroxidase antibody reactive protein in rat liver, *J Nutr* 117(4), 732-8.
145. Kobayashi Y, Ogra Y, Suzuki KT, 2001, Speciation and metabolism of selenium in rats injected with ⁸²Se-enriched selenate and selenite, *J Chromatogr*, 760, 73-81.

146. Koenig RJ, Leonard JL, Senator D, Rappaport N, Watson AY, Larsen PR, 1984, Regulation of thyroxine 5'-deiodinase activity by 3,5,3'-triiodothyronine in cultured rat anterior pituitary cells, *Endocrinology*, 115, 324–329.
147. Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T, 1997, Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells, *Endocrinology*, 138, 2227-2232.
148. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN, 2003, Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science*, 300, 1439–1443.
149. Kumar S, Bjornstedt M, Holmgren A, 1992, Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen, *Eur J Biochem*, 207, 435–439.
150. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN, 2007, The Sep15 protein family: roles in disulfide bond formation and quality control in the endoplasmic reticulum, *IUBMB Life*, 59, 1–5.
151. Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F, 1996, Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat, *Journal of Physiology*, 494, 831-837.
152. Larsen PR, 1975, Thyroidal triiodothyronine and thyroxine in Graves' disease: correlation with presurgical treatment, thyroid status, and iodine content, *J Clin Endocrinol Metab*, 41, 1098–104.
153. Larsen PR, Dick TE, Markovitz BP, Kaplan MM, Gard TG, 1979, Inhibition of intrapituitary thyroxine to 3.5.3'-triiodothyronine conversion prevents the acute suppression of thyrotropin release by thyroxine in hypothyroid rats, *J Clin Invest*, 64, 117–128.
154. Larsen PR, Frumess RD, 1977, Comparison of the biological effects of thyroxine and triiodothyronine in the rat, *Endocrinology*, 100, 980–988.
155. Larsen PR, Silva JE, Kaplan MM, 1981, Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications, *Endocr Rev* 2, 87–102.
156. Lee BJ, Worland PJ, Davis JN, Stadtman TC, Harfield DI, 1989, Identification of a selenocysteinyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon UGA, *J Biol Chem*, 264, 9724-9727.
157. Lee SR, Kim JR, Kwon KS, Yoon HW, Levine RL, Ginsburg A, Rhee SG, 1999, Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver, *J Biol Chem* 274, 4722–4734.
158. Lei XG, Evenson JK, Thompson KM, Sunde RA, 1995, Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium, *J Nutr*, 125(6), 1438-46.
159. Leinfelder W, Zehelein E, Mandrad-Berthelot MA, Bock A, 1988, Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslatory inserts selenocysteine, *Nature*, 331, 723-725.

160. Leonard JL, 1988, Dibutyryl cAMP induction of Type II 5'-deiodinase activity in rat brain astrocytes in culture, *Biochem Biophys Res Commun*, 151, 1164–1172.
161. Leonard JL, Rosenberg IN, 1978, Thyroxine 5'-deiodinase activity of rat kidney: observations on activation by thiols and inhibition by propylthiouracil, *Endocrinology* 103, 2137–2144.
162. Leonard JL, Rosenberg IN, 1980, Characterization of essential enzyme sulfhydryl groups on thyroxine 5'-deiodinase from rat kidney, *Endocrinology*, 106, 444–451.
163. Leonard JL, Silva JE, Kaplan MM, Mellen SA, Visser TJ, Larsen PR, 1984, Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5'-deiodinases by thyroid hormone, *Endocrinology*, 114, 998–1004.
164. Li D, Desai-Yajnik V, Lo E, Schapira M, Abagyan R, Samuels HH, 1999, NRIF3 is a novel coactivator mediating functional specificity of nuclear hormone receptors, *Mol Cell Biol*, 19, 7191-7202.
165. Li Sui, Gilbert ME, 2003, Pre- and postnatal propylthiouracil-induced hypothyroidism impairs synaptic transmission and plasticity in Area CA1 of the neonatal rat hippocampus, *Endocrinology*, 144, 4195–4203.
166. Lu C, Qiu F, Zhou H, Peng Y, Hao W, Xu J, Yuan J, Wang S, Qiang B, Xu C, Peng X, 2006, Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes, *FEBS Lett*, 580, 5189–5197.
167. Lu J, Holmgren A, 2009, Selenoproteins, *J Biol Chem*, 284, 723-727.
168. Lundholm L, Putnik M, Otsuki M, Andersson S, Ohlsson C, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K, 2008, Effects of estrogen on gene expression profiles in mouse hypothalamus and white adipose tissue: target genes include glutathione peroxidase 3 and cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha-subunit-like effector, *A J Endocrinol*, 196, 547–557.
169. Lundström J, Holmgren A, 1990, Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity, *J Biol Chem*, 265, 9114–9120.
170. Magnusson RP, 1990, Thyroid peroxidase, In: Everse J, Grisham MB, eds, *Peroxidases on chemistry and biology*, Vol I, Boca Raton, CRC Press, 199.
171. Martin GW 3rd, Berry MJ, 2001, Selenocysteine codons decrease polysome association on endogenous selenoprotein mRNAs, *Genes Cells*, 6(2), 121-9.
172. May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF, 1998, Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase, *J Biol Chem*, 273, 23039–23045.
173. McConnell JW, Cho GJ, 1965, Transmucosal movement of selenium, *Am Physiol*, 208, 1191.
174. McKenzie RC, Arthur JR, Miller SM, Rafferty TS, Beckett GJ, 2002, Selenium and Immune function, In *Nutrition and Immune function*, pp 229-250, Eds PC Calder, CJ Field, HS Gill, Wallingford: CABI Publishing.

175. McMurray CH, Blanchflower WJ, 1976, The levels of selenium and glutathione peroxidase activity in blood of sheep, cows and pigs, *Res Vet Sci*, 20, 229-231.
176. Meinhold H, Campos-Barros A, Behne D, 1992, Effects of selenium and iodine deficiency on iodothyronine deiodinases in brain, thyroid and peripheral tissue, *Acta Med Austriaca*, 19, 8-12.
177. Meinhold H, Campos-Barros A, Walzog B, Kohler R, Muller F, Behne D, 1993, Effects of selenium and iodine deficiency on type I, type II and type III iodothyronine deiodinases and circulating thyroid hormones in the rat, *Exp Clin Endocrinol*, 101, 87-93.
178. Mihajlovi M, Vasiljevi Z, Šobaji S, Jovanovi I, Pešut O, Mati G, 2003, Antioxidant status of patients with acute myocardial infarction, *Trace Element and Electrolytes*, 20, 5-7.
179. Miranda-Vizuete A, Damdimopoulos AE, Pedrajas JR, Gustafsson JA, Spyrou G, 1999, Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization, *Eur J Biochem*, 261, 405-412.
180. Mittag J, Behrends T, Hoefig CS, Vennström B, Schomburg L, 2010, Thyroid hormones regulate selenoprotein expression and selenium status in mice, *PLoS One*, 22, 5(9), e12931.
181. Mizuma H, Murakami M, Mori M, 2001, Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells: expression of type II iodothyronine deiodinase, *Circ Res*, 88, 313-318.
182. Moghadaszadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, Romero N, Estournet B, Desguerre I, Chaigne D, Muntoni F, Topaloglu H, Guicheney P, 2001, Mutations in *SEPN1* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome, *Nat Genet*, 29, 17-18.
183. Molinero P, Osuna C, Guerrero JM, 1995, Type II thyroxine 5'-deiodinase in the rat thymus, *J Endocrinol*, 146, 105-111.
184. Moore T, Zhang Y, Fenley MO, Li H, 2004, Molecular basis of box C/D RNA-protein interactions: cocrystal structure of archaeal L7Ae and a box C/D RNA, *Structure*, 12, 807-817.
185. Motohashi H, Yamamoto M, 2004, Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism, *Trend Mol Med*, 10, 549-557.
186. Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Kamiya Y, Morimura T, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M, 2001, Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland, *Endocrinology*, 142, 2961-2967.
187. Nguyen TT, Chapa F, DiStefano III JJ, 1998, Direct measurement of the contributions of type I and type II 5'-deiodinases to whole body steady state 3,5,3'-triiodothyronine production from thyroxine in the rat, *Endocrinology*, 139, 4626-4633.
188. Nikitovi D, Holmgren A, 1996, S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide, *J Biol Chem*, 271, 19180-19185.

189. Obregon MJ, Larsen PR, Silva JE, 1986, The role of 3,3',5'-triiodothyronine in the regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase in the rat cerebral cortex, *Endocrinology*, 119, 2186–2192.
190. Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF, 2004, Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats, *Reproduction*, 127, 335–342.
191. Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF, 2008, Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells, *J Biol Chem*, 283, 6854–6860.
192. Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF, 2007, Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis, *J Biol Chem*, 282, 12290–12297.
193. Oppenheimer JH, 1979, Thyroid hormone action at the cellular level, *Science*, 203, 971–979.
194. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI, 1972, Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine: an explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone, *J Clin Invest*, 51, 2493–2497.
195. Ottavioano F, Tang S, Handy D, Loscalzo J, 2009, Regulation of the extracellular antioxidant selenoprotein plasma glutathione peoxidase (GPx-3) in mammalian cells, *Mol Cell Biochem*, 327, 111-126.
196. Pallud S, Lennon AM, Ramage M, Gavaret JM, Croteau W, Pierre M, Courtin F, St. Germain DL, 1997, Expression of the type II iodothyronine deiodinase in cultured rat astrocytes is selenium-dependent, *J Biol Chem*, 272, 18104–18110.
197. Panee J, Stoytcheva ZR, Liu W, Berry MJ, 2007, Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification, *J Biol Chem*, 282, 23759–23765.
198. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna K, 2007, From selenium to selenoproteins: synthesis, identity and their role in human health, *Antioxidans and Redox Signaling*, Vol 9, 7, 775-806.
199. Papp LV, Lu J, Striebel F, Kennedy D, Holmgren A, Khanna K, 2006, The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function, *Mol Cell Biol*, 26, 4895-4910.
200. Pappas AC, Zoidis E, Surai PF, Zervas G, 2008, Selenoproteins and maternal nutrition, *Comparativ Biochem Physiol*, 151, 361-372.
201. Park JY, Seong Jk, Paik JK, 2004, Proteomic analysis of diet-induced hypercholesterolemic mice, *Proteomics*, 514-523.
202. Pekary AE, Berg L, Santini F, Chopra I, Hershman JM, 1994, Cytokines modulate Type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cells, *Mol Cell Endocrinol*, 102, R31-R35.

203. Pešut Olivera, 1996, Sadržaj selena u hranivima i status selena ovaca na podru ju Ba ke, magistarska teza, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
204. Petanceska S, Devi L, 1992, Sequence analysis, tissue distribution and expression of rat cathepsin S, *J Biol Chem*, 267, 26038.
205. Petit N, Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Moghadaszadeh B, Wewer UM, Guicheney P, 2003, Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern, *Hum Mol Genet*, 12, 1045–1053.
206. Petrujki B, 2010, Uticaj selena organskog i neorganskog porekla dodatog u hranu na kvalitet sperme nerastova, doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
207. Philips ID, Black EG, Sheppard MC et al, 1989, Thyrotrophin, forskolin and ionomycin increase cathepsin B mRNA contrentation in rat thyroid cells in culture, *J Mol Endocrinol*, 2, 207.
208. Porat A, Sagiv Y, Elazar Z, 2000, A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport, *J Biol Chem*, 275, 14457-14465.
209. Pumford NR, Martin BM, Hinson JA, 1992, A metabolite of acetaminophen covalently binds to the 56 kDa selenium binding protein, *Biochem Biophys Res Commun*, 182, 1348-1355.
210. Radovanovi A, 2003, Uticaj smanjene funkcije štitaste žlezde na jajnike pacova tokom polnog sazrevanja, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
211. Rasmussen U, Rasmussen A, 2007, Thyroid hormone transport and actions, in *Diseases of the thyroid in childhood and adolescence*, Krassas GE, Rivkees SA, Kiess W (eds), *Pediatr adolesc med Basel*, 11, 80-103.
212. Rayman MP, 2002, The argument for increasing selenium intake, *Proceeding of the Nutrition Society*, 61, 203-215.
213. Renko K, Werner M, Renner-Muller I, Coopers T, Yeungs C, 2008, Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice, *Biochem J* 409, 741–749.
214. Rhee SG, Chae HZ, Kim K, 2005, Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling, *Free Radic Biol Med*, 38, 1543–1552.
215. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swason AB, Hafeman DG, Heekstra WG, 1973, Selenium biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, 179, 1957-1963.
216. Rundlof AK, Arner ES, 2004, Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events, *Antioxid Redox Signal* 6, 41–52.

217. Ruz M, Codoceo J, Galgani J, Munoz L, Gras N, Muzzo S, Leiva L, Bosco C, 1999, Single and multiple selenium-zinc-iodine deficiencies affect rat thyroid metabolism and ultrastructure, *J Nutr*, 129, 174-180.
218. Saedi MS, Smith CG, Frampton J, Chambers I, Harrison PR, Sunde RA, 1988, Effect of selenium status on mRNA levels for glutathione peroxidase in rat liver, *Biochem Biophys Res Commun* 16, 153(2), 855-61.
219. Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR, 1996, Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase, *Endocrinology*, 137, 3308–3315.
220. Salvatore D, Bartha T, Larsen PR, 1998, The guanosine monophosphate reductase gene is conserved in rats and its expression increases rapidly in brown adipose tissue during cold exposure, *J Biol Chem*, 273, 31092–31096.
221. Sandholm M, 1975, Function of erythrocytes in attaching selenite Se onto specific plasma proteins, *Acta Pharmacol Toxicol*, 36, 321.
222. Schmutzler C, Kohrle J, 2000, Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer, *Thyroid*, 10, 393-406.
223. Schoenmakers CHH, Pigmans IGAJ, Visser TJ, 1995, Investigation of type I and type III iodothyronine deiodinases in rat tissues using *N*-bromoacetyl-iodothyronine affinity labels, *Mol Cell Endocrinol*, 107:173–180.
224. Schmutzler C, Mentrup B, Schomburg L, Hoang-Vu C, Herzog V, Kohrle J, 2007, Selenoproteins of the thyroid gland: expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3, *Biol Chem*, 388, 1053–1059.
225. Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohe L, Sendtner M, Kohrle J, 2003, Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues, *Biochem J*, 370, 397–402.
226. Schweizer U, Streckfuss F, Pelt P, Carlson BA, Hatfield DL, Kohrle J, Schomburg L, 2005, Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply, *Biochem J*, 386, 221–226.
227. Segerson TP, Kauer J, Wolfe H, Mobitker H, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM, 1987, Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus, *Science*, 238, 78–80.
228. Shang WW, Luo J, Cheng WB, Huang Q, Wang WD, 2010, Effect of PTU on the expression of thyroid TPO, Tg mRNA in rats, *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 41, 428-431.
229. Shigeta K, Matsumura K, Suzuki Y, Shinohara A, Furuta N, 2008, Distribution and dynamic pathway of selenium species in selenium deficient mice injected with ⁸²Se-enriched selenite, *Anal Sci*, 24, 1117-22.
230. Shiobara Y, Suzuki KT, 1998, Binding of selenium (administreted as selenite) to albumin after efflux from red blood cells, *J Chromatogr B*, 710, 49-56.
231. Silva JE, Dick TE, Larsen PR, 1978, The contribution of local tissue thyroxine monodeiodination to the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine in pituitary, liver, and kidney of euthyroid rats, *Endocrinology*, 103, 1196–1207.

232. Silva JE, Gordon MB, Crantz FR, Leonard JL, Larsen PR, 1984, Qualitative and quantitative differences in pathways of extrathyroidal triiodothyronine generation between euthyroid and hypothyroid rats, *J Clin Invest*, 73, 898-907.
233. Silva JE, Larsen PR 1983 Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*, 305:712–713.
234. Silva JE, Larsen PR, 1978, Contributions of plasma triiodothyronine and local thyroxine monodeiodination to triiodothyronine to nuclear triiodothyronine receptor saturation in pituitary, liver, and kidney of hypothyroid rats: further evidence relating saturation of pituitary nuclear triiodothyronine receptors and the acute inhibition of thyroid-stimulating hormone release, *J Clin Invest*, 61, 1247–125.
235. Silva JE, Larsen PR, 1986b, Hormonal regulation of iodothyronine 5'-deiodinase in rat brown adipose tissue, *Am J Physiol*, 251, E639–E643.
236. Silva JE, Larsen PR, 1986a, Interrelationships among thyroxine, growth hormone, and the sympathetic nervous system in the regulation of 5'-iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue, *J Clin Invest*, 77, 1214–1223.
237. Silva JE, Leonard JL, 1985, Regulation of rat cerebrocortical and adenohipophyseal type II 5'-deiodinase by thyroxine, triiodothyronine, and reverse triiodothyronine, *Endocrinology*, 116, 1627–1635.
238. Small-Howard A, Morozova N, Stoytcheva Z, Forry EP, Mansell JB, Harney JW, Carlson BA, Xu XM, Hatfield DL, Berry MJ, 2006, Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo, *Mol Cell Biol*, 26, 2337-46.
239. Song S, Sorimachi K, Adachi K, Oka T, 2000, Biochemical and molecular biological evidence for the presence of type II iodothyronine deiodinase in mouse mammary gland, *Mol Cell Endocrinol*, 160, 173–181.
240. Stadtman ER, 2006, Protein oxidation and aging, *Free Radic Res*, 40, 1250–1258.
241. Stoytcheva Z, Berry M, 2009, Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression, *Biochim Biophys Acta*, 1790,1429-1440.
242. Sun QA, Kirnarsky L, Sherman S, Gladyshev VN, 2001, Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 3673–3678.
243. Sunde RA, Raines AM, Barnes KM, Evenson JK, 2008, Selenium status highly-regulates selenoprotein mRNA levels for only a subset of the selenoproteins in the selenoproteome, *Biosci Rep*, doi: 10.1042/BSR20080146
244. Sunde RA, Thompson KM, Evenson JK, Weiss SI, 1998, *Proc Nutr Soc*, 57, 155A.
245. Surai PF, 2006, *Selenium in nutrition and health*, Nottingham University Press, Nottingham.

246. Takahashi K, Akasaka M, Yamamoto Y, Kobayashi C, Mizoguchi J, Koyama J, 1990, Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences, *J Biochem (Tokyo)*, 108, 145–148.
247. Tamura T and Stadtman TC, 1996, A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 1006–1011.
248. Thomas JP, Girotti AW, 1988, Photooxidation of cell membranes in the presence of hematoporphyrin derivative: reactivity of phospholipid and cholesterol hydroperoxides with glutathione peroxidase, *Biochim Biophys Acta*, 962, 297–307.
249. Thompson K, Haibach H, Sunde R, 1995, Growth and plasma triiodothyronine concentrations are modified by selenium deficiency and repletion in second-generation selenium-deficient rats, *J Nutr* 125, 864-873.
250. Toyoda N, Berry MJ, Harney JW, Larsen PR, 1995a, Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1), *J Biol Chem* 270, 12310–12318.
251. Toyoda N, Nishikawa M, Mori Y, Gondou A, Ogawa Y, Yonemoto T, Yoshimura M, Masaki H, Inada M, 1992, Thyrotropin and triiodothyronine regulate iodothyronine 5'-deiodinase messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 rat thyroid cells, *Endocrinology*, 131, 389-94.
252. Toyoda N, Zavacki AM, Maia AL, Harney JW, Larsen PR, 1995b, A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene, *Mol Cell Biol*, 15, 5100–5112.
253. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L, 1999, Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation, *Science*, 285, 1393–1396.
254. Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE, Miot F, 1997, Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid, *Mol Cell Endocrinol*, 131,195–203.
255. Val i O, Jovanovi I, Milanovi S, 2011, Selenium, thiobarbituric acid reactive substances and thyroid hormone activation in broilers supplemented with selenium as selenized yeast or sodium selenite, *Japanese Journal of Veterinary Research*, 59, 69-77.
256. Valentine WM, Abel TW, Hill KE, Austin LM, Burk RF, 2008, Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67, 68–77.
257. Vanderpas JB, Contempré B, Duale NL, Goossens W, Bebe N, Thorpe R, Ntambue K, Dumont J, Thilly CH, Diplock AT, 1990, Iodine and selenium deficiency associated with cretinism in northern Zaire, *Am J Clin Nutr* 52, 1087-93.
258. Van der Puten HH, Friesema EC, Abumrad NA et al, 2003, Thyroid hormone transport by the rat fatty acid translocase, *Endocrinology*, 144, 1315-1323.

259. van Doorn JD, Roelfsema F, van der Heide D, 1983, The effect of propylthiouracil and methimazole on the peripheral conversion of thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine in athyreotic thyroxine-maintained rats, *Acta Endocrinol (Copenh)*, 103, 509–520.
260. Vendeland SC, Deagen JT, Butler JA, Whanger PD, 1994, Uptake of selenite, selenomethionine and selenate by brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine, *Biometals*, 7(4), 305-12 .
261. Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T, 1997, Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences and susceptibility to oxidative stress in rat tissue, *J Endocrinology*, 155, 151-157.
262. Veronikis IE, Braverman LE, Alex S, Fang SL, Norvell B, Emerson CH, 1996, Comparison of the effects of propylthiouracil and selenium deficiency on T₃ production in the rat, *Endocrinology*, 137, 2580–2585.
263. Visser TJ, Leonard JL, Kaplan MM, Larsen PR, 1982, Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex, *Proc Natl Acad Sci USA*, 79, 5080–5084.
264. Visser TJ, van der Does-Tobe I, Docter R, Hennemann G, 1976, Subcellular localization of a rat liver enzyme converting thyroxine into triiodothyronine and possible involvement of essential thiol groups, *Biochem J*, 157, 479–482.
265. Walczak R, Carbon P, Krol A, 1998, An essential non-Watson-Crick base pair motif in 3'UTR to mediate selenoprotein translation, *RNA*, 4, 74-84.
266. Weiss Sachdev S, Sunde R, 2001, Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver, *J Biochem*, 357, 851-858.
267. Weiss SL, Evenson JK, Thompson KM, Sunde RA, 1996, The selenium requirement for glutathione peroxidase mRNA level is half of the selenium requirement for glutathione peroxidase activity in female rats, *J Nutr*, 126(9), 2260-7.
268. Westholm DE, Stenehjem DD, Rumbley JN, Drewes LR, Anderson GW, 2009, Competitive inhibition of organic anion transporting polypeptide 1c1-mediated thyroxine transport by the fenamate class of nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Endocrinology*, 150, 1025–1032.
269. Whanger PD, 2002, Selenocompounds in plants and animals and their biological significance, *J Am Coll Nutr*, 21,3,223-232.
270. Whanger PD, Butler JA, 1988, Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats, *J Nutr*, 118, 846-852.
271. Whanger PD, Pedersen ND, Hatfield J, Weswig PH, 1976, Absorption of selenite and selenomethionine from ligated digestive tract segments in rats, *Proc Soc Exper Biol Med* 153,295.
272. Whanger PD, Vendeland SC, Park YC, Xia Y, 1996, Metabolism of subtoxic levels of selenium in animals and humans, *Ann Clin Lab Sci*, 26, 99-113.

273. Wingler K, Brigelius-Flohe R, 1999, Gastrointestinal glutathione peroxidase, *Biofactors*, 10, 245–249.
274. Wolfram S, 1999, Absorption and metabolism of selenium: difference between inorganic and organic sources. In: *Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of 15th Alltech's Annual Symposium*, Ed Lyons TP and Jacques KA, Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp 547-566.
275. Wolfram S, Arduser F, Scharrer E, 1985, In vivo intestinal absorption of selenate and selenite in rats, *J Nutr*, 115, 454.
276. Wu Y, Koenig R, 2000, Gene regulation by thyroid hormone, *TEM*, 11, 6, 207-211.
277. Xu XM, Carlson BA, Irons R, Mix H, Zhong N, Gladyshev VN, Hatfield DL, 2007a, Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis, *Biochem J* 404, 115–120.
278. Xu XM, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL, 2007b, Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes, *PLoS Biol.* 5(1):e4.
279. Xu XM, Mix H, Carlson BA, Grabowski PJ, Gladyshev VN, Berry MJ, Hatfield DL, 2005, Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and SLA, in the selenoprotein synthesis machinery, *J Biol Chem*, 280, 41568-41575.
280. Yang FY, Fen C, Tu YP, 1996, Se-mediated domain-domain communication in band 3 of human erythrocytes, *Biol Trace Elem Res* 55(3), 279-95.
281. Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibata T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA, 2003, The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults, *Free Radic Biol Med*, 34, 496–502.
282. Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA, 2004, A membrane protein complex mediates retrotranslocation from the ER lumen into the cytosol, *Nature*, 429, 841–847.
283. Yoshida M, Nakazono N, 1995, Effect of ingestion of 6-propyl-2-thiouracil on biochemical indices of selenium status in rats, *J Toxicol Sci*, 20, 23-28.
284. Yoshimura S, Wantanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T, 1991, Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney, *J Biochem*, 109, 918-923.
285. Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY, Roeder RG, 1998, The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor- associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 7939-7944.
286. Zhao R, Masayasu H, and Holmgren A, 2002, Ebselen, a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 8579–8584.
287. Zhong L, Arner ES, Holmgren A, 2000, Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redoxactive

selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 5854–5859.

288. Zhong L, Holmgren A, 2000, Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations, *J Biol Chem*, 275, 18121–18128.
289. Zhou Y, Samson M, Osty J, Francon J, Blondeau JP, 1990, evidence for a close link between the thyroid hormone transport system and the aromatic amino acid transport system in erythrocytes, *Jour of endocrinology*, 265, 17000-17004.

9. Skra enice

T4- tiroksin

T3- trijodtironin

TSH- tireostimuliraju i hormon

PTU- propiltiouracil

IA- jopanoi na kiselina

GPx1- citosolna glutation peroksidaza

ID1- jodotironin dejodinaza 1

ID2- jodotironin dejodinaza 2

SPS2- selenofosfat sintetaza 2

Sec- selenocistein

Biografija autora

Mr Svetlana Milanović rođena je 14.05.1973. godine u Beogradu. Nakon završene srednje škole (Peta beogradska gimnazija) upisala je 1992. god. studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, smer *Veterinarska medicina*. Diplomirala je 8.07.1998. godine sa prosečnom ocenom 9,21. Školske 1998/99. godine upisala je posle diplomске magistarske studije, smer *Patologija i terapija domaćih životinja* na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu i u roku položila sve ispite predviđene planom i programom, sa prosečnom ocenom 9,00. Na radno mesto asistenta pripravnika za predmet Biohemija na Katedri za fiziologiju i biohemiju Veterinarskog fakulteta u Beogradu primljena je u martu 2001. godine.

Magistarsku tezu pod naslovom: *Uporedno ispitivanje uticaja organski i neorganski vezanog gvožđea na hematološke parametre, imunski odgovor, količinu u organima i proizvodne rezultate pilića u toku* odbranila je 15. 12. 2005. god. na Veterinarskom fakultetu u Beogradu.

Mr Svetlana Milanović je od 1998 do 2001. godine bila stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju i angažovana na projektu: *Izučavanje etiopatogeneze, genetičkih i ekoloških faktora u cilju unapređenja zaštite zdravlja, povećanja proizvodno reproduktivnih karakteristika životinja i zdravstvene ispravnosti namirnica animalnog porekla* (12M18).

Od **2002. do 2006.** godine je bila angažovana na projektima:

- *Ispitivanje lokalne i sistemske imunološke reaktivnosti junica i krava na antigene spermatozoida i razređivanja za spermu bika* (OI 1998)
- *Zajednički deficit joda i selena u Srbiji kao faktor rizika za zdravlje i proizvodne osobine domaćih životinja* (OI 1881)

Od **2006. do 2010.** godine je bila angažovana na projektu: *Ekofiziološka i genetička istraživanja domaćih životinja i pčela u funkciji povećanja reproduktivnih svojstava i otpornosti na bolesti* (OI 1870).

Od **2011.** godine je angažovana na projektu: *Biotehnologija u regulaciji proizvodnog i reproduktivnog statusa i zdravstvenog stanja kod visokomlečnih krava* (TP 31050)

Tokom dosadašnje karijere objavila je preko dvadeset naučnih radova u međunarodnim i domaćim naučnim časopisima, ili saopštila na naučnim skupovima.

1.

- _____

0112/20

„ _____ e

_____ -

_____ - “

- ,
-

- ,
-

/

, 22.6.2012.

2.

o

: _____

0112/20

: _____

: " _____

e _____

_____ " _____

: _____

/

.

,

,

,

.

, 22.6.2012.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

‘Утицај пропилтиоурацила и јопаноичне киселине на функцију тиреоидне осовине и активност глутатион пероксидаза код селен-дефицијентних и селен-адекватних јувенилних пацова’

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, 22.6.2012.

Милосавић