

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ

Јелена Б. Бјелица

УТИЦАЈ ДЕФИЦИТА СЕЛЕНА И  
БЛОКАТОРА ДЕЈОДИНАЗА НА УРОЂЕНИ И  
СТЕЧЕНИ ИМУНСКИ ОДГОВОР ЈУВЕНИЛНИХ  
ПАЦОВА

Докторска дисертација

Београд, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Jelena B. Bjelica

THE INFLUENCE OF SELENIUM  
DEFICIENCY AND DEIODINASE INHIBITORS  
ON INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE  
RESPONSES IN JUVENILE RATS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

**Ментор:**

Др Иван Јовановић, редовни професор  
Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

**Комисија:**

Др Иван Јовановић, редовни професор  
Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Др Светлана Милановић, доцент  
Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Др Весна Илић, научни саветник  
Институт за медицинска истраживања Универзитета у Београду

Датум одбране:

---

*Безграничну захвалност дугујем дивним људима чија несебична професионална и пријатељска подршка су омогућили да се један велики подухват приведе крају.*

*Најпре желим да изразим велику захвалност свом ментору, проф. др Ивану Јовановићу, без чије визије овај рад не би био започет, на указаном поверењу, стрпљењу, драгоцену помоћи и усмеравању у стручном раду.*

*Захваљујем се доц. др Светлани Милановић, која је имала невероватну улогу у свим сегментима израде ове дисертације, за немерљив допринос кроз напоран рад, вредне савете и безрезервну подршку у сваком тренутку.*

*Др Весни Илић, научном саветнику Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, дугујем изузетну захвалност за помоћ при извођењу анализа и непроцењиве савете и сугестије током обраде резултата и финализације тезе.*

*Др Славку Мојсиловићу, научном сараднику Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду се захваљујем за огроман допринос при извођењу аналитичких поступака.*

*Захваљујем се др Сањи Врањеш-Ђурић, научном саветнику Института за нуклеарне науке Винча, др Срђану Стефановићу, истраживачу сараднику на Институту за хигијену и технологију меса, колеги др Срђану Јоксимовићу и колегама са Факултета ветеринарске медицине, проф др Данијели Кировски и проф др Дарку Маринковићу, за помоћ при извођењу огледа и анализа.*

*Посебну и неизмерну захвалност дугујем прим. Томиславу Соларовићу, директору Агенције за лекове у време када је овај рад започет, за подржавање реализације једног великог пројекта, као и драгим пријатељима Горану Росићу и Дејану Тадићу, за исказано поверење и безгранични оптимизам током свих ових година.*

*За пријатељску подршку захваљујем својим колегама из Агенције за лекове.*

*Најзаслужнијима, мојој породици, захвалност за разумевање што им нисам увек била на располагању, за безусловну љубав, пажњу и стрпљење.*

## Утицај дефицита селена и блокатора дејодиназа на урођени и стечени имунски одговор јувенилних пацова

### Резиме

У оквиру ове докторске дисертације испитиван је утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на урођени и стечени имунски одговор јувенилних пацова. Експеримент је рађен на 128 *Wistar* пацова мушког пола, подељених у осам експерименталних група: 1. Se+PTU-IA- (контролна група), 2. Se+PTU-IA+, 3. Se+PTU+IA-, 4. Se+PTU+IA+, 5. Se-PTU-IA-, 6. Se-PTU-IA+, 7. Se-PTU+IA- и 8. Se-PTU+IA+. Половини пацова који су формирали селенадекватне групе (Se+) давана је храна са адекватним садржајем селена (0,334 mg/kg). Другој половини пацова који су формирали селендефицитне групе (Se-) давана је храна са ниским садржајем селена (0,031 mg/kg). Као инхибитори дејодиназа примењивани су пропиотиоурацил (PTU+) у дози од 150 mg/L воде за пиће и јопаноична киселина (IA+) у дози од 6 mg/100 g телесне масе.

Треће недеље огледа одређивани су статус селена (концентрација селена у пуној крви и активност GPx1 у крви и GPx3 у крвној плазми), статус тиреоидних хормона (концентрација T3, T4 и TSH у плазми), способност адхеренце и продукције пероксида перитонеалних макрофага *in vitro* и титар природних IgM антитела крвне плазме реактивних са антигенима овчијих еритроцита. Друга половина пацова сваке групе је имунизована у петој и седмој недељи огледа 10%-ном суспензијом овчијих еритроцита. Након седам недеља огледа одређен им је статус селена и хормона тиреоидне осовине, целуларност слезина, релативна заступљеност (%) и апсолутни број Т и Б лимфоцита и НК ћелија у слезини и титар IgM и IgG антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита.

У групама са селендефицитном исхраном потврђен је селендефицитни статус пацова. Примена PTU или комбинације PTU и IA узроковала је системску хипотиреозу, док код пацова третираних јопаноичном киселином није утврђена системска хипотиреоза.

Дефицит селена довео је до смањења продукције пероксида од стране перитонеалних макрофага. Примена инхибитора дејодиназа у селенадекватним

групама није значајно утицала на ниво адхеренце макрофага. Након 60 минута инкубације највиши ниво адхеренце је установљен у селендефицидној групи нетретираној инхибиторима дејодиназа.

Укупан број леукоцита слезине био је значајно смањен код група пацова код којих је постојала системска хипотиреоза и био је у корелацији са просечном телесном масом одговарајуће групе. Најизраженији утицај примењених третмана забележен је на популацији Б лимфоцита чији је релативни и апсолутни број био нижи у свим групама осим у групи селендефицичних пацова третираних комбинацијом РТУ и IA. Релативна заступљеност популације Т лимфоцита слезине је била значајно повећана код пацова селенадекватне и селендефицидне групе у којој је примењиван само РТУ и у селенадекватној групи третираној са IA. Примена РТУ у селендефицичним групама, самостално и у комбинацији са јопаноичном киселином, довела је до смањења апсолутног броја Т лимфоцита. Однос субпопулација Т лимфоцита је био значајно измењен само у групи селендефицичних пацова третираних комбинацијом РТУ и IA. Релативна заступљеност популације НК ћелија слезине је била смањена код селенадекватних пацова третираних са оба инхибитора истовремено и код пацова селендефицидне нетретиране групе, а њихов апсолутни број у селенадекватној групи третираној са оба инхибитора и обе селендефицидне групе пацова којима је даван РТУ.

Селендефицидне групе животиња имале су виши титар природних IgM антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита у односу на контролну групу. Примењени третмани нису значајно утицали на титар специфичних IgM и IgG секретованих након примарне и секундарне имунизације антигенима овчијих еритроцита.

Кључне речи: селен, пропилтиоурацил, јопаноична киселина, тиреоидни хормони, макрофаги, Т лимфоцити, Б лимфоцити, НК ћелије, природна и имуна антитела.

Научна област: ВЕТЕРИНАРСКА МЕДИЦИНА

Ужа научна област: БИОХЕМИЈА, ЕНДОКРИНОЛОГИЈА, ИМУНОЛОГИЈА,  
НАУКА О МИКРОЕЛЕМЕНТИМА

УДК: 577.1 : 612.43 : 546.23

# **The Effect of Selenium Deficiency and Deiodinase Inhibitors on Innate and Adaptive Immune Responses in Juvenile Rats**

## **Summary**

The effect of selenium deficiency and deiodinase inhibitors on innate and adaptive immune responses in juvenile rats was investigated within this doctoral thesis. The experiment was carried out on 128 male *Wistar* rats, randomly assigned into 8 experimental groups: 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- and 8. Se-PTU+IA+. Rats belonging to selenium deficient groups (Se-) were fed with selenium deficient diet (0,031 mg/kg feed). Rats in the other study arm (Se+) were provided with a selenium adequate diet containing 0.334 mg Se/kg feed. Propylthiouracil (PTU+) in a final concentration of 150 mg/L of drinking water, and iopanoic acid (IA+) administered in dose of 6 mg/kg bw, were used as deiodinase inhibitors.

Three weeks after the beginning of the experiment the following parameters were determined: selenium status (selenium concentration in full blood; GPx1 activity in blood and GPx3 activity in plasma); thyroid status (T3, T4 and TSH concentration in plasma); rat peritoneal macrophage adherence capacity and peroxide production *in vitro* and titer of naturally acquired IgM reactive with sheep red blood cells. In the 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> week of the experiment, the other half of rats in each arm was immunized with 10% suspension of sheep red blood cells. After seven weeks of experiment, selenium and thyroid status of these animals, spleen cellularity, proportion (%) and absolute number of spleen T and B lymphocytes and NK cells, and titers of IgM and IgG antibodies reactive with sheep red blood cells were determined.

Selenium deficient status was confirmed in all rats belonging to selenium deficient groups. Treatment with PTU alone or in combination with IA resulted in development of systemic hypothyreosis, while systemic hypothyreosis was not established in rats treated with iopanoic acid.

Selenium deficiency resulted in reduction of peroxide production in peritoneal macrophages. Deiodinase inhibitors did not affect adherence level in selenium adequate



macrophages. After 60 minutes of incubation, macrophages in selenium deficient group not treated with deiodinase inhibitors expressed the highest level of adherence.

Total number of spleen leukocytes was significantly reduced in groups that developed systemic hypothyreosis and it was in close correlation with average body mass in the corresponding experimental group. The most pronounced effect of the applied treatments was observed in population of B lymphocytes, with their proportion and absolute number significantly reduced in all groups, except in selenium deficient group treated simultaneously with PTU and IA. The proportion of spleen T lymphocyte population was significantly increased in selenium adequate and selenium deficient rats treated with PTU alone, and in selenium adequate rats treated with IA. PTU administration in selenium deficient groups, alone or in combination with iopanoic acid, led to reduction of the absolute number of T lymphocytes. Ratio of T lymphocyte subpopulations was significantly changed only in the group of selenium deficient rats treated with combination of PTU and IA. Relative content of NK cell population in spleen was reduced in selenium adequate rats treated simultaneously with both inhibitors and in selenium deficient untreated rats, and their absolute number was reduced in selenium adequate group treated with both inhibitors and both selenium deficient groups treated with PTU.

Levels of naturally acquired IgM antibodies reactive with sheep red blood cells were significantly elevated in comparison to control group. After primary and secondary immunization with sheep erythrocyte antigens, no differences in specific IgM and IgG levels between experimental groups were observed.

Key words: selenium, propylthiouracil, iopanoic acid, thyroid hormones, macrophages, T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, naturally acquired and immune antibodies

Science: VETERINARY MEDICINE

Specific science: BIOCHEMISTRY, ENDOCRINOLOGY, IMMUNOLOGY, MICROELEMENTS

UDK: 577.1: 612.43: 546.23

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b>	<b>1</b>
<b>2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Селен</b>	<b>5</b>
2.1.1. Селенопротеини	5
2.1.1.1. Синтеза селенопротеина	6
2.1.1.2. Регулација синтезе селенопротеина	6
2.1.1.3. Селенопротеом	7
2.1.1.3.1. Глутатион пероксидазе	7
2.1.1.3.2. Јодотиронин дејодиназе	8
<b>2.2. Селен и имунитет</b>	<b>12</b>
2.2.1. Селенопротеини у ћелијама имунског система	14
2.2.2. Утицај селена на компоненте урођеног имунитета – макрофаге и НК ћелије	16
2.2.2.1. Макрофаги	16
2.2.2.2. НК ћелије	21
2.2.3. Утицај селена на компоненте стеченог имунитета – Б и Т лимфоците	22
2.2.3.1. Б лимфоцити и синтеза антитела	22
2.2.3.2. Т лимфоцити	25
<b>2.3. Хормони тиреоидне осовине</b>	<b>28</b>
2.3.1. Тиреоидни хормони и селен	28
2.3.2. Механизми деловања тиреоидних хормона	29
2.3.3. Антитиреоидни лекови	30
<b>2.4. Хормони тиреоидне осовине и имунитет</b>	<b>31</b>
2.4.1. Утицај тиреоидних хормона на компоненте урођеног имунитета – макрофаге и НК ћелије	36
2.4.1.1. Макрофаги	36
2.4.1.2. НК ћелије	38
2.4.2. Утицај тиреоидних хормона на компоненте стеченог имунитета – Б и Т лимфоците	41
2.4.2.1. Б лимфоцити и синтеза антитела	41
2.4.2.2. Т лимфоцити	44

<b>3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА</b>	<b>48</b>
<b>4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Материјал</b>	<b>49</b>
4.1.1. Експерименталне животиње	49
4.1.2. Дизајн експеримента	49
<b>4.2. Методе</b>	<b>53</b>
4.2.1. Одређивање концентрације селена	53
4.2.2. Одређивање активности глутатион пероксидаза	54
4.2.3. Одређивање концентрације хормона тироидне осовине	55
4.2.4. Испитивање функције перитонеалних макрофага	56
4.2.4.1. Тест адхеренце макрофага	57
4.2.4.2. Синтеза водоник пероксида у макрофагима	57
4.2.5. Одређивање титра IgM и IgG антитела на овчије еритроците	58
4.2.6. Одређивање релативне заступљености (%) и апсолутног броја Б, Т, NK ћелија у слезини методом проточне цитометрије	59
<b>4.3. Статистичка обрада резултата</b>	<b>62</b>
<b>5. РЕЗУЛТАТИ</b>	<b>63</b>
5.1. Статус селена и статус хормона тироидне осовине селенадекватних и селендефицилних пацова	63
5.2. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на продукцију пероксида у перитонеалним макрофагима	66
5.3. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на адхеренцу перитонеалних макрофага	68
5.4. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на целуларност слезине и релативни и апсолутни број основних ћелијских популација: Б и Т лимфоцита и NK ћелија	75
5.4.1. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на целуларност слезине – број леукоцита	75
5.4.2. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупан број леукоцита слезине) и апсолутни број Б лимфоцита у слезинама пацова	79
5.4.3. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупан број леукоцита слезине) и апсолутни број укупних Т лимфоцита у слезинама пацова	83

5.4.4.	Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупну популацију Т лимфоцита) CD45RA <sup>+</sup> и CD45RA <sup>-</sup> субпопулација Т лимфоцита у слезинама пацова	87
5.4.5.	Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупан број леукоцита слезине) и апсолутни број NK ћелија у слезинама пацова	90
5.4.6.	Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (%) популација ћелија слезине: Збирни приказ	94
5.5.	Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на хуморални имунски одговор пацова	96
5.5.1.	Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар природних и имуних IgM антитела	96
5.5.2.	Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар IgG антитела	101
<b>6.</b>	<b>ДИСКУСИЈА</b>	<b>105</b>
6.1.	Продукција водоник пероксида код перитонеалних макрофага пацова	106
6.2.	Адхеренца перитонеалних макрофага пацова	111
6.3.	Целуларност слезина пацова	118
6.4.	Б лимфоцити	122
6.5.	Т лимфоцити	126
6.5.1.	Укупни Т лимфоцити	126
6.5.2.	Субпопулације Т лимфоцита	130
6.6.	NK ћелије	130
6.7.	Хуморални имунитет	133
6.7.1.	Титар природних IgM реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми пацова	133
6.7.2.	Титар IgM и IgG антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми пацова након примарне и секундарне имунизације суспензијом овчијих еритроцита	134
<b>7.</b>	<b>ЗАКЉУЧЦИ</b>	<b>137</b>
<b>8.</b>	<b>СПИСАК ЛИТЕРАТУРЕ</b>	<b>140</b>
<b>9.</b>	<b>СКРАЋЕНИЦЕ</b>	<b>167</b>
	<b>БИОГРАФИЈА</b>	

## 1. УВОД

Од како је, након што је сматран токсичним елементом, селен препознат као есенцијални микронутријент (Schwartz и Foltz, 1957) и касније као интегрални део ензима глутатион пероксидазе (Rotruck и сар., 1973; Flohe и сар., 1973), научна сазнања о значају и улогама селена у организму људи и животиња су знатно проширена. Установљено је да поред глутатион пероксидаза и други ензими припадају селенопротеинима и садрже селен у свом каталитичком центру, у облику селеноцистеина - нетипичне, 21. аминокиселине која се у полипептидни ланац уграђује котранслаторно, помоћу специфичног механизма који UGA кодон на mRNA не чита као стоп кодон, већ као кодон за уграђивање селеноцистеина у насцентни полипептид. Испитивања на ћелијским културама и анималним моделима показала су да у синтези селенопротеина постоји хијерархија, како у условима адекватног тако и у условима дефицитног снабдевања селеном, као и да је за одређена ткива и органе карактеристично приоритетно снабдевање, односно боље одржавање нивоа селена и синтезе селенопротеина у условима његовог дефицита (Parr и сар., 2007). Сматра се да је хијерархија у синтези селенопротеина у корелацији са њиховим значајем за ћелијске функције и функцију целог организма.

Описани концепт важи и за имунски систем. Иако се генерално може рећи да на нивоу организма овај систем има одређену предност у снабдевању селеном, изгледа да постоје и различити нивои приоритета унутар овог система. Односно, постоји разлика у осетљивости на дефицит селена између појединачних ткива и ћелијских популација, што треба имати у виду при процени утицаја нутритивног дефицита овог олигоелемента на њихов развој и функцију. Познато је да статус селена утиче на функцију свих компоненти имунског система, али његова имуномодулациона улога и механизми путем којих се она остварује још увек нису довољно објашњени. У ћелијама имунског система експримирани су различити селенопротеини чији се значај и улоге, иако делом познати, тек откривају (Huang, 2012). Механизам којим се најчешће објашњава утицај селена обухвата његову улогу у антиоксидативној заштити, тј. регулацију нивоа реактивних врста кисеоника (*Reactive Oxygen Species*; ROS)

и редокс потенцијала, посредовану глутатион пероксидазама и тиоредоксин редуктазама. Дефицит селена утиче на капацитет фагоцита за респираторни прасак (Baker и Cohen, 1983; Parnham и сар., 1983; Spallholz и Boylan, 1989). Селен има антиинфламаторно деловање (Beck и сар., 2001; Vunta и сар., 2007; Duntas 2009). У условима дефицита селена описано је смањење броја Т лимфоцита (Kiremidjian-Schumacher и сар., 1994), смањена пролиферација и диференцијација Т лимфоцита (Kiremidjian-Schumacher и сар., 1992; Kiremidjian-Schumacher и сар., 1990; Roy и сар., 1994) и смањена цитолитичка активност НК ћелија (Ravaglia и сар., 2000). Такође, забележено је смањење броја Б лимфоцита у слезинама мишева у односу на селенадекватну контролу (Vega и сар., 2007). На продукцију антитела ниво селена има различит утицај, у зависности од врсте и узраста животиње, врсте патогена односно имуногена коришћеног у испитивању, као и претходног нутритивног статуса јединке у испитивањима утицаја надокнаде селена (Turner и Finch, 1991; Marsh и сар., 1981; Huang и сар., 2012). У складу са наведеним, дефицит селена је повезан са слабијим имунским одговором на вирусе, туморе и алергене (Hoffmann и Berry, 2008), а може утицати и на вирулентност патогена (Beck и сар., 2001; Nelson и сар., 2001). Статус селена утиче и на одговор организма на имунизацију (Broome и сар., 2004; Giadinis и сар., 2000; Hawkes и сар., 2001).

С обзиром на комплексност међусобних интеракција, разумевање односа и узајамног деловања неуроендокриног и имунског система још увек је непотпуно. Тиреоидни хормони своје ефекте остварују кроз геномске или негеномске механизме. Како ови хормони имају кључну улогу у расту, развоју, диференцијацији и метаболизму ћелија и ткива (Yen, 2001), очекивано је да њихов измењени статус утиче и на имунски одговор. Утицај промене статуса хормона тиреоидне осовине на имунитет је описан у научној литератури и бројним прегледним радовима (De Vito и сар, 2011; De Vito и сар, 2012). Иако су ставови о утицају хипо- и хипертиреозидизма на поједине параметре имунског система делом усаглашени, показало се да све функције имунитета нису јасно регулисане променама тиреоидног статуса. Описано је да хипотиреоза код макрофага пацова подстиче фагоцитозу и ослобађање ROS, али не утиче на миграцију моноцита (Costa Rosa и сар., 1995). Хипотиреоза

индукована на различите начине код експерименталних животиња доводи до инволуције тимуса, слезине и лимфних чворова (Fabris, 1973; Bendyug и сар., 2003). Литературни подаци о утицају тиреоидних хормона на хуморални имунски одговор су контрадикторни: наводи се да хипотиреоидни статус не утиче на хуморални имунски одговор (Foster и сар., 2000) или да доводи до његове супресије (Fabris, 1973; Bendyug и сар., 2003), односно да тиреоидни хормони подстичу хуморални имунски одговор (Klecha и сар., 2000). Са друге стране, описује се и смањење титра антитела узроковано применом тиреоидних хормона, а виши титар антитела након примене пропилтиоурацила (енглески: *Propylthiouracil*; PTU), тиоамидног лека који се користи у терапији хипертиреоидизма (De Vito и сар., 2011). Примена PTU је повезивана са супресивним или стимулативним деловањем на имунски систем; у испитивању на пацовима се показало да у зависности од дужине третмана иста доза PTU може имати различито дејство на продукцију антитела (Duarte и сар., 2003), односно да различите дозе могу деловати стимулативно или инхибиторно (Kai и сар., 1988; Kai и сар., 1993).

Значај селена за функцију тиреоидне жлезде и тиреоидни статус је одавно познат. Централну улогу у активацији и инактивацији тиреоидних хормона имају јодотиронин дејодиназе, оксидоредуктазе које у свом каталитичком центру садрже селеноцистеин, те представљају везу између селена и метаболизма тиреоидних хормона (Behne и сар., 1990; Arthur и сар., 1990; Berry и сар., 1991a; Berry и сар., 1991b). Ови селеноензими катализују реакције дејодинације тироксина (T<sub>4</sub>), 3,5,3'-тријодтиронина (T<sub>3</sub>) и реверзног-3,5,3'-тријодтиронина (rT<sub>3</sub>), односно активирају и деактивирају тиреоидне хормоне. Због свог значаја имају приоритет у синтези у односу на друге селенопротеине, у условима дефицита селена. Механизам регулације експресије дејодиназа нивоом селена није у потпуности објашњен, али је највероватније специфичан за ткиво/орган и карактерише га хијерархија и унутар саме суперфамилије дејодиназа (Parr и сар., 2007). Иако већина истраживања указује на минимално присуство дејодиназа у ћелијама имунског система (Huang и сар., 2012), кроз утицај на ниво тиреоидних хормона оне могу утицати на системску расположивост селена за синтезу различитих

селенопротеина, укључујући и оне укључене у имунске одговоре и инфламацију (Mittag и сар., 2010). Међутим, новији научни подаци указују и на могућност индуковане експресије дејодиназа у одређеним популацијама имунских ћелија, као што је дејодиназа типа 3 у неутрофилима (Boelen и сар., 2008) или типа 2 у Купферовим ћелијама (Kwakkel и сар., 2014). Ћелијски специфично, индуковано присуство овог ензима у условима каква је инфламација потврђено је и у другим типовима ћелија које је иначе не експримирају (Wittmann и сар., 2014; Ма и сар., 2011; Барса Мауо и сар., 2011). Наведени подаци сугеришу да на експресију дејодиназа, поред већ познатих фактора као што су ниво тиреоидних хормона и статус селена, вероватно утиче и измењени имунски статус организма. У специфичним условима, ћелијски захтеви за тиреоидним хормонима могу бити измењени и њихов ниво се локално контролише активношћу дејодиназа, што не мора да прати промена нивоа ових хормона у циркулацији.

Даљим проширивањем знања о улогама селенопротеина постаће јаснији механизми помоћу којих селен директно или индиректно утиче на различите физиолошке или патофизиолошке процесе у области имунитета. Испитивање утицаја специфичних блокатора дејодиназе типа 1 и дејодиназе типа 2 на имунски статус, у комбинацији са дефицитом селена, би кроз праћење параметара неспецифичног, хуморалног и ћелијског имунитета могло указати на механизам интеракције тиреоидног статуса и статуса селена у регулацији функција имунског система.



## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. Селен

Иако је дуго сматран само токсичним елементом, селен је препознат као есенцијални микронутријент када су Schwarz и Foltz (1957) установили да спречава некрозу јетре пацова узроковану дефицитом витамина Е. Нешто касније доказана је и биолошка функција селена као саставног дела ензима глутатион пероксидазе (Rothruck и сар., 1973; Flohe и сар., 1973).

Одавно је препознато да дефицит селена у исхрани повећава предиспозицију за појаву различитих патолошких промена и обољења код људи и животиња (Chen и сар., 1980; Kiremidjian-Schumacher и Stotzky, 1987; Vanderpas и сар., 1990; Beck и сар., 2001; Yao и сар., 2011; Blood и сар., 1983). Иако случајеви екстремно високог или дефицитног уноса селена нису чести и јављају се првенствено у ендемским селениферним или селендефицитним подручјима, треба имати у виду да и мање изражене промене у статусу селена могу утицати на различите функције организма, између осталог имуномодулационо. Бројна истраживања спроведена последњих деценија су допринела проширивању знања о функцијама селена и потврдила његов есенцијални значај за здравље животиња и људи, укључујући улогу селена у оптималном имунском одговору.

#### 2.1.1. Селенопротеини

Своју биолошку улогу селен пре свега остварује уграђен у селенопротеине у облику нетипичне аминокиселине селеноцистеина. Протеини који у свом функционалном делу као интегрални део полипептидног ланца садрже селен у облику селеноцистеина (SeCys), сматрају се правим селенопротеинима. Другу групу протеина са селеном, много мању, чине они протеини код којих је селен чврсто везан за пептид али не у облику селеноцистеина, међу којима је највише проучен селен-везујући протеин 1 (*Selenium Binding Protein 1- SBP1*) (Ansong и сар., 2014). Селен може бити

уграђен у телесне протеине и неспецифично, у облику селенометионина. Пошто систем за изградњу протеина не разликује селенометионин од обичног метионина, сматра се да је неспецифично уграђивање резултат већег уноса селенометионина, ниског нивоа метионина или ниског односа интрацелуларног S/Se (Behne и Kyriakopoulos, 2001).

#### **2.1.1.1. Синтеза селенопротеина**

Синтеза селенопротеина је еволутивно конзервисан процес (Parr и сар., 2007). Док се аминокиселина селенометионин неспецифично уграђује у протеине уместо метионина и не постоји специфичан кодон за њену уградњу у полипептидни ланац, селеноцистеин се уграђује у протеине помоћу UGA кодона. Селеноцистеин се котранслаторно, током синтезе, уграђује у полипептидни ланац помоћу специфичног механизма који UGA кодон на iRNA не чита на уобичајен начин, као "стоп" кодон, већ као кодон за уграђивање ове аминокиселине у насцентни полипептид. Биосинтеза селеноцистеина се одвија на посебној tRNA (Lee и сар., 1989).

#### **2.1.1.2. Регулација синтезе селенопротеина**

Испитивања на животињама и ћелијским културама показала су да и код адекватног и код дефицитног снабдевања селеном постоји хијерархија у синтези селенопротеина, као и то да одређена ткива и органе карактерише боље одржавање нивоа селена и синтезе селенопротеина у условима његовог дефицита (Parr и сар., 2007). Дефицит селена различито утиче на ниво iRNA селеноензима и њихову активност у различитим ткивима, при чему промена у нивоу iRNA не мора да прати и промене у активности ензима. Биосинтеза селеноцистеина и фактори који утичу на његово уграђивање у протеин представљају главну регулациону тачку у контроли синтезе селенопротеина, бар на моделу ћелијске културе (Parr и сар., 2007). Ниво расположивог селена је кључни регулаторни фактор у синтези селенопротеина и делује пре свега на посттранскрипцијом, иако се наводи могућност деловања и на

транскрипционом нивоу (Parr и сар., 2007). Према истим ауторима, остале главне регулационе компоненте у синтези селенопротеина су расположивост есенцијалних *транс*-фактора и редокс регулација SECIS-везујућег протеина типа 2 (енглески: *SECIS-binding protein 2*; SBP2) коришћењем тиоредоксин и глутаредоксин система.

### **2.1.1.3. Селенопротеом**

Селенопротеом људи и глодара броји 25, односно 24 различита селенопротеина. Хумани селенопротеом чини 17 фамилија селенопротеина, које обухватају глутатион пероксидазе (GPx), тиоредоксин редуктазе (TrxR), јодотиронин дејодиназе (D1, D2, D3) и селенофосфат синтетазе (SPS); остали селенопротеини су 15-kDa селенопротеин/Sep15, SelH, SelI, SelK, SelM, SelN, SelO, SelP/SepP, SelR, SelS, SelT, SelV, и SelW. Селенопротеини имају различите улоге и различиту ткивну и унутарћелијску расподелу. Познате су функције само неколицине, укључујући GPx, TrxR, SPS2 и дејодиназе, које имају улогу оксидоредуктаза (Parr и сар., 2007). У испитивањима на *knockout* моделима мишева је установљено да су поједини селенопротеини есенцијални за ембриогенезу и да је њихова делеција ембриолетална (TrxR1, TrxR 3 и GPx4) (Kasaikina и сар, 2012).

#### **2.1.1.3.1. Глутатион пероксидазе**

Глутатион пероксидазе катализују редукцију водоник пероксида и органских хидропероксида користећи глутатион (GSH) као редукционо средство, чиме штите ћелије од оксидативног оштећења. Глутатион пероксидазе сисара GPx1-4 су селенопротеини са SeCys у каталитичком центру, док је GPx6 селенопротеин само код људи (Brigelius-Flohé и Maiorino, 2013). Ова субфамилија обухвата GPx1 (ћелијска глутатион пероксидаза), GPx2 (интестинална глутатион пероксидаза), GPx3 (глутатион пероксидаза крвне плазме), GPx4 (фосфолипидна глутатион пероксидаза) и GPx6.

Ћелијска глутатион пероксидаза (GPx1) је рангирана ниско у хијерархији синтезе селенопротеина и стога је осетљива на промене у нивоу расположивог селена. Она представља кључни ензим у метаболизму H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и антиоксидативној заштити организма и присутна је практично у свим ћелијама (Flohe и сар., 1971). У лимфним чворовима, слезини и тимусу мишева је високо експримирана GPx1 iRNA (Carlson и сар., 2010).

Ензим GPx3 је ванћелијска глутатион пероксидаза, тетрамер који се синтетише у бубрезима, срцу и тиреоидној жлезди и лучи у крв (глутатион пероксидаза плазме). Као и GPx1, осетљива је на промене у нивоу расположивог селена и користи се као биохемијски параметар за одређивање статуса селена. Супстрати GPx3 су H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, хидропероксиди масних киселина и фосфолипидни хидропероксиди (Brigelius-Flohé и сар., 2013).

#### **2.1.1.3.2. Јодотиронин дејодиназе**

Јодотиронин дејодиназе су централни ензими у активацији и инактивацији тиреоидних хормона; то су оксидоредуктазе које у свом каталитичком центру садрже SeCys, те представљају везу између метаболизма селена и тиреоидних хормона. У фамилији дејодиназа су идентификована три ензима са различитом ткивном дистрибуцијом и субцелуларном локализацијом, различитом дистрибуцијом и нивоом експресије у ткивима током ембрионалног развоја и у организму одраслих животиња, и разликама у ткивној дистрибуцији међу врстама животиња (Bianco и сар., 2002; Kuiper и сар., 2005; Bianco и Kim, 2006). Све дејодиназе су структурно сличне и представљају интегралне мембранске протеине локализоване у плазма мембрани (D1 и D3) или у мембрани ендоплазматског ретикулума (D2) (Ваqui и сар., 2000; Ваqui и сар., 2003).

Дејодиназе катализују реакције дејодинације тироксина (T4), 3,5,3'-тријодтиронина (T3) и реверзног-3,5,3'-тријодтиронина (rT3). Од T4 дејодинацијом на фенолном прстену молекула (спољашња или 5' дејодинација) посредованом ензимима D1 и D2, настаје краткоживећи, биолошки активни T3.

Иререверзибилну инактивацију, дејодинацијом унутрашњег или тирозилног прстена (5 дејодинација), катализује D3, али и D1.

### *Дејодиназа тип 1 (D1)*

Дејодиназа типа 1 (D1) је једини ензим из ове групе који може да функционише као дејодиназа спољашњег (5') и унутрашњег прстена (5) (Fekkes и сар., 1982). Овај ензим катализује дејодинацију оба прстена T4 једнако ефикасно, што зависи од pH (Leonard и Visser, 1986). Како су дејодиназе селенопротеини, дефицит селена утиче на њихову експресију и активност. Bergamo и сар. (1995) описују да је исхрана јувенилних пацова селендефицитном храном (0,003 mg Se/kg) у периоду од 6 недеља након одлучења, довела до пада активности D1 у јетри од 95% и смањења нивоа D1 mRNA од 50%. Са друге стране се у истом огледу у тиреоидеји активност D1 одржала или чак повећала за 15%, а ниво mRNA за 95%. Различити ефекти дефицита селена на исти ензим у зависности од његове локализације потврђују преференцијално одржавање експресије селеноензима у одређеним ткивима, какво је овде уочено одржавање активности D1 у тиреоидеји у циљу ублажавања утицаја дефицита селена на метаболизам тиреоидних хормона (Bergamo и сар., 1995). Сличне резултате бележе и други истраживачи (Meinhold и сар., 1992; Becket и сар., 1987; Becket и сар., 1989, Bates и сар., 2000). Тиреоидни хормони имају најзначајнију улогу у регулацији активности D1 и експресији њене mRNA, са стимулацијом експресије код повећања њиховог нивоа (Kaplan и Utiger, 1978; Harris и сар., 1978; Berry и сар., 1990). Инактивацију и разградњу овог ензима подстичу супстрати какав је јопаноична киселина или rT3 (St. Germain, 1988a), али ензим не подлеже убиквитинацији (Gereben и сар., 2000). За разлику од других дејодиназа, овај ензим је изузетно осетљив на инхибицију пропилтиоурацилом (Oppenheimer и сар., 1972; Leonard и Rosenberg, 1978). Пропилтиоурацил и дефицит селена имају сличан утицај на активност D1 јетре и бубрега и периферну продукцију T3 (Veronikis и сар., 1996).

## *Дејодиназа тип 2 (D2)*

Иако се сматрало да је код људи D1 кључни ензим за контролу нивоа T3 у циркулацији, каснија испитивања су показала да у еутиреоидном статусу главни допринос T3 у плазми даје D2, док је учешће D1 ензима веће у хипертиреози, односно код високог нивоа T4 у плазми (Maia и сар., 2005). Ензим D2 је дејодиназа спољашњег прстена која катализује конверзију T4 у T3 и rT3 у 3,3'-T2. То је кључни ензим хомеостатског система који контролише унутарћелијску концентрацију T3 (Steinsapir и сар., 2000; Kaiser и сар., 1986). Код мишева и пацова, D2 је најјаче експримирана у централном нервном систему, хипофизи и мрком масном ткиву, а активност јој је доказана и у тимусу, епифизи, гонадама, гравидном утерусу, као и у кохлеи и млечној жлезди миша (Croteau и сар., 1996). Ниво D2 mRNA у тиреоидеји пацова је веома низак, а активност D2 испод прага детекције (Gereben и сар., 2001). Међутим, иако је у еутиреоидном стању ниско експримирана, утврђено је да у стању хипотиреозе код миша долази до значајног повећања D2 у срцу и тестисима (Wagner и сар., 2003). Новија испитивања су показала да је овај ензим експримиран у епителним и пулмоналним ендотелним ћелијама у моделу акутног оштећења плућа (Ma и сар., 2011), као и у макрофагима јетре током инфламације (Kwakkel и сар., 2014), али и у другим типовима ћелија у специфичним условима (Wittmann и сар., 2014; Varca Mayo и сар., 2011). Полуживот D2 је јако кратак (мање од 1 сат) и скраћује се након излагања супстратима, тј. T4 и rT3 (па чак и T3 у високим концентрацијама) који убрзавају његову разградњу путем убиквитин-протеазом система (Steinsapir и сар., 2000; Kaiser и сар., 1986; St. Germain, 1988b). Тиреоидни статус контролише експресију D2 на пре- и посттранслационом нивоу (Silva i Larsen, 1986; Germain, 1985), са већом експресијом у хипотиреози. Према Beckett и сар. (1989) селендефицитна исхрана смањује активност овог ензима код пацова. За разлику од D1, активност D2 не инхибира пропилтиоурацил, 100 пута мање је осетљива од D1 на инхибицију јодоацетатом и GTG (злато-тиоглукоза) (Visser и сар., 1982; Salvatore и сар., 1996), док је као и остале дејодиназе конкуритивно инхибира јопаноична киселина (St. Germain, 1988b).

### *Дејодиназа тип 3 (D3)*

Трећи ензим укључен у дејодинацију тиреоидних хормона је D3, који катализује дејодинацију на унутрашњем прстену T4, T3 и 3,3'-T2. Овај ензим није инхибиран пропилтиоурацилом. Практично D3 има само активност дејодинације унутрашњег прстена и катализује конверзију T4 и T3 у биолошки неактивне rT3 односно 3,3'-T2, чиме доприноси одржавању хомеостазе и штити ткива од вишка активних хормона. Експресија D3 је високорегулисана у ткивима фетуса и новорођених животиња, тако да обезбеђује координисану регулацију ефеката тиреоидних хормона на развој. Ензим D3 је присутан у централном нервном систему и кожи одраслих пацова (Bates и сар., 1999), високо је експримиран у плаценти пацова и људи и гравидном утерусу пацова (Galton и сар., 1999), а код новорођених пацова се налази и у скелетним мишићима, јетри и цревима (Bates и сар., 1999). Индукована експресија овог ензима је утврђена у неутрофилима током инфламације (Voelen и сар., 2008), али и макрофагима (Voelen и сар., 2009).

### *Улоге дејодиназа у одржавању системског и локалног нивоа тиреоидних хормона*

Код пацова око 40% T3 лучи штитаста жлезда, а око 50% екстратиреоидне конверзије T4 у T3 катализује D1 (Bianco и сар., 2002), што потврђују и резултати директног мерења учешћа дејодиназа типа 1 и 2 на продукцију T3 из тироксина, према којима D2 у њој учествује са 50% (Nguyen и сар., 1998). Хомеостатски механизми који регулишу синтезу тиреоидних хормона у штитастој жлезди, експресију и активност дејодиназа, односно метаболизам тиреоидних хормона, обезбеђују да концентрације слободног T4 и T3 у плазми буду константне тако да су ткива изложена њиховим уједначеним концентрацијама. Међутим, концентрација T3 и сатурација тиреоидних рецептора у различитим ткивима варирају у зависности од активности дејодиназа присутних у самом ткиву, тако да концентрација тиреоидних хормона у плазми не утиче једнако на све ћелије и ткива. Промена системског

тиреоидног статуса тако највише утиче на ткива која немају способност активације или инактивације тиреоидних хормона и чији статус директно зависи од концентрације слободног T3 у плазми, док у ткивима која експримирају D2 и/или D3 промене у активности ових дејодиназа омогућују локалну контролу нивоа активног хормона. У ткивима за која је плазма једини извор T3, промене у његовој концентрацији током хипо- или хипертиреозе одражавају се директно на окупираност тиреоидних рецептора (TR) и биолошке ефекте у овим ткивима. Једарни T3 у ткивима која не експримирају D2 је готово потпуно T3 из плазме (Larsen и сар., 1981; van Doorn и сар., 1983). Локално стварање T3 из T4, деловањем D2, омогућује локално повећање заузетости тиреоидних рецептора без истовремене промене нивоа T3 у циркулацији (Marsili и сар., 2011). Како је локално настали T3 из кинетички различитог пула у односу на T3 плазме, окупираност рецептора у овим ткивима је виша (70-90%), а 50-80% T3 везаног за TR је управо онај који је настао интрацелуларном дејодинацијом T4 (Bianco и сар., 2002). Присуство D2 у ћелији тако омогућава одржавање интрацелуларне хомеостазе у овим ткивима у условима системске хипотиреозе.

## **2.2. Селен и имунитет**

Механизми одбране организма обухватају урођену имуност која посредује у раној заштити организма, и стечену имуност која се развија спорије и обезбеђује каснију, али ефикаснију одбрану. Ефикасан имунски одговор је резултат интеракција и усклађене активности различитих компоненти оба система, а адекватан нутритивни статус је кључан за његову оптималну функцију.

Кроз активност селенопротеина, ниво селена у исхрани утиче на компоненте урођеног и стеченог имунитета, а механизми преко којих се његов ефекат остварује су врло комплексни. Иако се у већини случајева дефицит селена повезује са слабијим одговорима на различите антигене у односу на селенадекватну контролу, а његова надокнада са обнављањем имунокомпетенце, односно стимулацијом имунског система, овај однос није



тако једноставан. Виши ниво селена је генерално у позитивној корелацији са заштитом организма код инфекција узрокованих вирусима, док је за остале патогене ситуација мање јасна. Тако је утврђено да дефицит селена може да утиче на развој неких вирусних инфекција кроз повећање осетљивости на инфекцију делујући на имунски систем, а некад и на саме узрочнике (Yu и сар., 2011; Beck и сар., 1994; Beck и сар., 2001; Nelson и сар., 2001). Да је код дефицита селена супримиран одговор имунског система, потврђује и забележена већа учесталост инфекција неким вирусима у селендефицитним областима (Fang и сар., 2015).

За разлику од вируса, код невирусних патогена утицај статуса селена зависи од врсте узрочника, па је тако чак описан позитиван утицај дефицита селена: селендефицитне мишеве карактерише нижа паразитемија и бржи клиренс трипанозома (*T. musculi*) из циркулације у односу на селенадекватну контролу, могуће због недостатка класичне глутатион редуктазе и селен-зависне глутатион пероксидазе у ћелијама паразита због чега оне зависе од селен - зависних антиоксидативних система домаћина (Ongele и сар., 2000).

Дефицит селена се повезује и са различитим обољењима у чијој основи је аутоимуна реакција, какав је Хашимотов тиреоидитис и аутоимуни реуматоидни артритис (Toullis и сар., 2010; Pemberton и сар., 2009). Описано је да надокнада селена доводи до смањења нивоа аутоантитела на тиреоидну пероксидазу код људи (Gärtner и сар., 2002), мада је овај ефекат у даљим клиничким испитивањима доведен у питање, а вероватно је и да постигнути ефекат зависи од статуса селена у организму пре суплементације. Код алергијских реакција и стања каква је астма, селен има двоструку улогу: са једне стране делује као снажан антиоксиданс и смањује оксидативни стрес, а са друге делује подстицајно на имунски систем, па су у складу са тим и резултати испитивања утицаја селена у овој области контрадикторни (Hoffmann и Berry, 2008). Статус селена утиче и на одговор организма на имунизацију, са различитим ефектима који зависе од врсте примењеног имуногена.

### 2.2.1. Селенопротеини у ћелијама имунског система

Како наводе Huang и сар. (2012), ниво експресије одређених селенопротеина у ћелијама имунског система зависи од нивоа расположивог селена, типа ћелије и нивоа њене диференцијације, као и од тога да ли се ћелија налази у стању мировања или је активирана. Током саме активације имунских ћелија може доћи до промене у експресији селенопротеина, што може бити и показатељ њиховог значаја или улоге у процесу активације или функцији ћелије. Испитивања експресије iRNA селенопротеина у лимфатичним ткивима при адекватном снабдевању селеном указују на низак ниво или изостанак експресије iRNA неких селенопротеина, какви су нпр. D1, D2 и D3, GPx2 и SelV (Huang и сар., 2012), мада новија истраживања дају и друге податке (Kwakkel и сар., 2014, Voelen и сар., 2008; Voelen и сар., 2009). Методом RT-qPCR је код макрофага мишева установљен релативно висок ниво експресије iRNA за селенопротеине GPx1, GPx4, TrxR1, Sep15 и селенопротеине P, R, K, T и SPS2, са највише експримираном iRNA глутатион-пероксидазе GPx1, а затим Sep15, GPx4 и селенопротеина P, K и T (Carlson и сар., 2009). У Т лимфоцитима слезине миша су најзаступљеније iRNA за GPx1 и GPx4, Sep15, Selp и Selk. Ниво експресије iRNA селенопротеина у Т ћелијама и макрофагима мишева је у физиолошким условима сличан (Carlson и сар., 2009). Иако се за ензим D2 наводи низак ниво експресије у ћелијама имунског система, Molinero и сар. (1995) наводе да је у тимоцитима и ћелијама строме тимуса пацова присутна дејодиназа D2 која по својим карактеристикама одговара D2 типу присутном у другим ткивима, укључујући зависност од тиреоидног статуса и пораст активности у хипотиреоидизму. Према Kwakkel и сар. (2014), ензим D2 је специфично експримиран у Купферовим ћелијама мишева током инфламације. Иако није експримирана у стању мировања, током акутне и хроничне инфламације долази до повећања експресије iRNA и активности D2 код ових макрофага, што према овим ауторима указује на значај овог ензима и локалног нивоа T3 за функцију ових ћелија током инфламације.

У условима дефицита селена и за ткива имунског система важи принцип хијерархијске контроле синтезе селенопротеина. Тако Ueno и сар. (2008)

наводе да је након 8 недеља селендефицичне исхране ( $24,4 \pm 19.0 \mu\text{g Se/kg}$ ) ниво селена у тимусу и слезини мишева био смањен за више од 50% у односу на полазне вредности, али је истовремено смањење концентрације селена у крви, серуму, бубрезима и јетри било много израженије, са скоро потпуном деплецијом селена. Овај статус је потврдила и активност GPx1 која је у јетри износила 1%, а у слезини 62% од селенадекватне контроле, и активност TrxR од око 32% у јетри и 72% у слезини у односу на контролу. Наведени подаци потврђују на есенцијални значај селена за имунски систем и указују да је слезина орган у ком се селен преференцијално тј. дуже задржава у условима нутритивног дефицита. Испитивање експресије iRNA селенопротеина у органима имунског система бројлера (Yang и сар., 2016) у условима селендефицичне исхране, показало је смањење нивоа iRNA за сва 23 испитивана селенопротеина при чему је ниво D1 у тимусу, TrxR2 у слезини и TrxR3 у *Bursa fabricii* био значајно смањен (редом 90,9%, 83,3% и 96,8%). Такође је утврђено да је дефицит селена претежно утицао на експресију антиоксидативних селенопротеина, пре свега глутатион пероксидаза и тиоредоксин редуктаза, као и јодотиронин дејодиназа. У испитивању експресије селенопротеина у тимоцитима пилића храњених селендефицичном храном (Naga и сар., 2001), установљена је значајно смањена експресија iRNA селенопротеина у односу на контролу, а сличан резултат су добили Khoso и сар. (2015), који су утврдили и измену у продукцији и односу различитих цитокина, на основу чега закључују да дефицит селена може резултирати развојем оксидативног стреса у ткиву тимуса са последичном имуносупресијом. Huang и сар. (2012) наводе да нижи статус селена у ћелијама имунског система има јачи ефекат на одређене селенопротеине са антиоксидантним улогом, по чему се он не разликује од других ткива.

## **2.2.2. Утицај селена на компоненте урођеног имунитета – макрофаге и НК ћелије**

### **2.2.2.1. Макрофаги**

Макрофаги и моноцити имају бројне и разноврсне улоге у физиолошким и патолошким процесима, укључујући индукцију и регулацију инфламације, регулацију хематопоезе, активацију и регулацију различитих компоненти имунског система, фагоцитозу и микробицидно деловање, уклањање туморских ћелија и инфицираних ћелија, као и улогу у ремоделирању и обнављању ткива (Auger, 1989). Ефекат селена на функцију ових ћелија испитиван је кроз утицај његовог дефицита или вишка на способност фагоцитозе, оксидативни капацитет, микробицидно дејство, миграторне способности, као и понашање ових ћелија у инфламаторној реакцији.

*Утицај дефицита селена на продукцију реактивних кисеоничних врста код макрофага*

Продукција реактивних кисеоничних врста (ROS) је кључна за микробицидно деловање фагоцитних ћелија, али и за интрацелуларну сигнализацију и међућелијску комуникацију. Ниво створених ROS у макрофагима је контролисан антиоксидативним механизмима како би се спречило оштећење ћелијских структура и обезбедила контрола ћелијског редокс тонуса и нормална функција ћелије. Како је једна од основних функција селенопротеина уклањање оксиданаса и заштита редокс осетљивих биолошких процеса (Parr и сар., 2007), један од начина на који селен остварује свој ефекат је регулација продукције и нивоа ROS. Глутатион пероксидаза фагоцита кроз редукцију липидних пероксида и  $H_2O_2$  може да смањи концентрацију хидропероксида у цитосолу, чиме омогућава очување активности ензима и интегритета лизозомалних мембрана (Serfass и Ganther, 1976). Активност GPx код макрофага је једна од највиших у поређењу са другим ткивима, а дефицит селена је значајно редукује. Serfass и Ganther (1976) уочавају значајно смањену

активност GPx1 перитонеалних макрофага након четири недеље селендефицитне исхране и наводе да смањење активности овог ензима код фагоцита наступа брже него код еритроцита, код исхране са истом концентрацијом селена (Hafeman и сар., 1974). Други аутори (Parnham и сар., 1983) бележе и спорији пад активности GPx1 макрофага, тј. након око два месеца селендефицитне исхране.

Safir и сар. (2003) потврђују утицај дефицита селена на активност GPx1 у *in vitro* испитивању на J774.1 ћелијској линији, са смањењем од преко 90% у селендефицитним условима у односу на ћелије са суплементацијом селена. Надокнада селена је позитивно утицала на фагоцитозу, продукцију супероксидног анјона након стимулације са PMA, дегранулацију и продукцију цитокина код ових ћелија. И Parnham и сар. (1983) описују утицај смањене активности глутатион пероксидазе селендефицитних перитонеалних макрофага на продукцију ROS након стимулације респираторног праска: у зависности од начина стимулације, продукција H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> је била смањена или повећана у односу на селенадекватну контролу. Воупе и сар. (1986) наводе да је код макрофага пореклом од селендефицитних пацова значајно редукована (за 95%) активност GPx1 у односу на селенадекватну контролу, уз смањену способност фагоцитозе и микробицидног деловања на *C.albicans*, *in vitro*. У истраживању Eskew и сар. (1985), није забележен утицај дефицита селена и/или витамина Е на функцију резидентних алвеоларних макрофага. Аутори претпостављају да су се у условима дефицита селена и оксидативног стреса укључили компензаторни механизми за одржавање функције ових ћелија, и не искључују могућност да би измењени услови активације или излагање индукторима значајнијег оксидативног стреса од оних примењених у огледу, довели до поремећаја функције ових ћелија.

Дефицит селена се повезује са измењеним оксидативним статусом неактивираних ћелија (у мировању). Carlson и сар. (2010) утврђују повишен ниво ROS у стању мировања код макрофага миша са потпуном деплецијом селенопротеина на нивоу ћелије (*ΔTrspM*) постигнутом циљаном делецијом гена *Trsp* (*Sec tRNA* гена). Један од најзначајнијих ензима за одржавање редокс тонуса у ћелији је тиоредоксин редуктаза, део тиоредоксин система. У складу

са овим резултатима, смањена експресија антиоксидативних селеноензима (пре свега GPx и TrxR1) индукована дефицитом селена, спречила би корекцију измењеног ћелијског редокс тонуса узрокованог стварањем ROS и тиме могла да измени сигнализацију и правилну активацију фагоцита. Stýblo и сар. (2007) наводе да дефицит селена не мора нужно да резултира значајно повећаном продукцијом ROS и развојем оксидативног стреса, али деловање додатног прооксидативног стресора може довести до оксидативних оштећења ћелије. Слично закључују Hu и сар. (1984), према којима смањена активност GPx не мора да доведе до оксидативног оштећења, али је оно могуће код екстремног дефицита селена, истовременог дефицита неког другог антиоксиданса какав је витамин Е, или присуства других оксидативних стресора.

#### *Утицај дефицита селена на адхеренцу макрофага*

Способност макрофага да учествују у започињању и регулацији имунског одговора и инфламације не зависи само од природе стимулуса, већ и од порекла мононоуклеарних фагоцита, као и тога да ли су ћелије адхерентне или не (Kunkel и Duque, 1983). Адхеренца је неходан корак у процесу активације макрофага (Nelson и сар., 1963). У испитивању оксидативног метаболизма код тиогликолатом индукованих перитонеалних макрофага, установљено да се продукција  $H_2O_2$  и  $O_2^-$  стимулисана применом РМА драстично повећава код адхерираних ћелија у односу на ћелије у суспензији (Cohen и сар., 1981). Ћелијска инфилтрација у ткива захтева адхезију моноцита и лимфоцита из периферне циркулације на ендотелне ћелије и њихову миграцију до места инфламације (Huang и сар., 2012). Међућелијске интеракције и интеракције ћелија и матрикса су део процеса сигнализације за моноците укључене у имунске одговоре (Sporn и сар., 1990). Показано је да адхеренца појачава туморицидну (Friedman и Beller, 1987) и бактерицидну активност (Bohnsack и сар., 1985) макрофага и да је значајна у активацији имунског одговора на вирусе (Shen и сар., 1995).

Адхеренца ћелија је посредована специфичним интеракцијама површинских рецептора ћелије и екстрацелуларних гликопротеина. Најбоље

описани ћелијски рецептори укључени у адхезију су интегрини: они су медијатори адхезије, миграције, стварања екстрацелуларног матрикса и трансдукције сигнала (Akiyama, 1996).

Huang и сар. (2012) наводе да надокнада селена може да смањи ћелијску адхеренцу кроз смањење експресије површинских рецептора, што може бити механизам којим се код повећаног уноса селена редукује инфламација. Установљено је да активација транскрипционог фактора NF-κB повећава експресију адхезивних молекула E-селектина, васкуларног адхезивног молекула (VCAM-1) и интрацелуларног адхезивног молекула (ICAM-1), док његова инхибиција редукује адхезију и миграцију леукоцита (Tak и Firestein, 2001). Контролом нивоа ROS преко GPx, селен спречава активацију NF-κB (Duntas, 2009) и тако може да утиче на експресију ових молекула. Селеном посредована инхибиција синтезе TNFα, који је снажан индуктор експресије адхезивних молекула, какви су ICAM-1, VCAM-1 и E-селектин, може да смањи адхезивне способности ћелија (Zhang и сар., 2002). Надокнада селена је код хуманих моноцита резултирала њиховим смањеним котрљањем и адхезијом (Ahrens и сар., 2008), као и повећаним уклањањем L-селектина, што се тумачи као могући механизам којим селен модулира миграцију или хемотаксу различитих имунских ћелија (Huang и сар., 2012). У огледу Dalla Puppa и сар. (2007) претретман селеном је смањио експресију субјединице CD11a интегрина индуковану применом H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Carlson и сар. (2009) описују да потпуна делеција селенопротеина на нивоу макрофага утиче на експресију гена који су повезани са формирањем и ремоделирањем екстрацелуларног матрикса и ћелијском интеракцијом са екстрацелуларним матриксом (ECM) и редукује им способност миграције.

#### *Утицај дефицита селена на макрофаге током инфламације*

Посебна група испитивања обухвата анализу утицаја селена на функцију макрофага током инфламације. У зависности од стимулуса, макрофаги у инфламраним ткивима могу стећи различите фенотипе: продуковати ROS и деловати микробицидно, или подстицати обнављање ткива и супримирати

инфламацију (Gordon и Taylor, 2005). Према Nelson и сар. (2011) статус селена у макрофагима је кључан за експресију алтернативно активiranог фенотипа индукованог интерлеукином 4 (IL4), односно надокнада селена скреће проинфламаторни M1 ка антиинфламаторном M2 фенотипу.

Макрофаги на процес инфламације, између осталог, утичу продукцијом оксипидних метаболита укључујући еикосаноиде, на чију синтезу утиче унос селена и статус селенопротеина. Тако тиогликолатом индуковане макрофаге перитонеалног ексудата код већ описаних  $\Delta Trsp^M$  мишева карактерише, у односу на контролу, значајно повећање експресије ензима COX2, 15-LOX1, 15-LOX2 и 5-LOX који учествују у синтези оксипина; повећање експресије iRNA проинфламаторног цитокина TNF $\alpha$  и кадхерина (CHD11) - трансмембранског протеина који има улогу у ћелијској адхезији и посредује у миграцији макрофага током инфламације; смањена продукција деривата арахидонске киселине (AA) који имају антиинфламаторно дејство: липоксина A4 (LXA<sub>4</sub>) и деривата линолеинске киселине 9-оксо-октадекадиеноичне киселине (9-охоODE) (Mattmiller и сар., 2014). Повећана експресија CHD11 и TNF $\alpha$  код макрофага перитонеалног ексудата  $\Delta Trsp^M$  мишева указује да смањена активност селенопротеина за последицу има појачан проинфламаторни фенотип (Mattmiller и сар., 2014).

Како је већ наведено, статус селена модулира активност NF- $\kappa$ B, транскрипционог фактора који је укључен у покретање акутног инфламаторног одговора и који регулише експресију проинфламаторних ензима каква је циклооксигеназа 2 (COX-2), као и хемокина и цитокина какви су TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL8 и адхезивних молекула (Tak и Firestein, 2001). Према Beck и сар. (2001), дефицит селена резултира вишим нивоом интрацелуларних ROS и последичном стимулацијом NF- $\kappa$ B, односно делује проинфламаторно. Иако механизми нису у потпуности објашњени, Vunta и сар. (2007) тумаче антиинфламаторни ефекат селена као последицу скретања метаболизма AA у макрофагима са проинфламаторног простагландина E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ка антиинфламаторном 15d-PGJ<sub>2</sub> простагландину, снажном инхибитору NF- $\kappa$ B пута. Подаци из испитивања утицаја селена на метаболизам AA код макрофага указују да селен скреће метаболизам AA ка продукцији PGD2 и на тај начин



подстиче повлачење инфламације (Huang и сар., 2012). Ензим COX-2 је појачано експримиран код различитих обољења са којима је повезан и недовољан унос селена: реуматоидни артритис, кардиомиопатија и канцер (Zamamiri-Davis и сар., 2002). Ови истраживачи утврђују обрнуту корелацију између статуса селена и експресије COX-2 на RAW 264.7 ћелијској линији.

#### 2.2.2.2. NK ћелије

NK ћелије су хетерогена популација лимфоцита коју карактерише спонтано цитолитичко деловање усмерено на различите врсте туморских или инфицираних ћелија (O'Shea и Ortaldo, 1992). Рана испитивања везе селена и NK ћелија су се у основи базирала на хипотези да селен испољава антитуморогено деловање и да је један од механизма којим га остварује подстицање цитотоксичног деловања ових ћелија. И већина касније спроведених испитивања се фокусира на модулаторни утицај селена на њихову цитолитичку активност.

У огледима са надокнадом селена је показано да у одређеном опсегу доза постоји његов стимулаторни утицај на NK ћелије пацова. Утицај селена је најпре објашњаван кроз стимулацију продукције интерферона (IFN) или интерлеукина 2 (Talcott и сар., 1984). Даљим истраживањима је показано да стимулација цитотоксичне активности NK ћелија и лимфоцита додавањем селена није била праћена порастом ендогеног нивоа IL1, IL2 или IFN $\gamma$  већ појачаном експресијом субјединица IL-2 рецептора на површини активираних лимфоцита и NK ћелија, што је резултирало њиховом појачаном пролиферацијом (Kiremidjian-Schumacher и Roy, 1998), односно повећањем експресије IL2R (*intermediate affinity interleukin-2 receptor*) и последично веће литичке активности активираних NK ћелија (Kiremidjian-Schumacher и сар., 1996). Зависност ефекта од примењене дозе селена је потврђена у тесту цитотоксичности *in vitro* где је забележен инхибиторни ефекат највише примењене дозе (Nair и Schwartz, 1990). Kiremidjian-Schumacher и сар. (1994) описују повећање активности NK ћелија за 82,3% у односу на базалне вредности након суплементације Na-селенитом током 8 недеља код људи, што

је такође објашњено појачаном експресијом рецептора за IL-2; при томе нису забележене значајне промене у нивоу селена у плазми. Са друге стране, исхрана пацова селендефицитном исхраном (мање од 0,05 ppm селена) након одлучења, током 18 недеља, није негативно утицала на цитолитичко дејство NK ћелија у тесту на туморској YAC-1 ћелијској линији, иако су ниво селена у плазми и активност GPx еритроцита били значајно редуковани (10,3% и 8,8%) у односу на контролну селенадекватну групу (Poffenbarger и сар., 1989).

NK ћелије имају улогу у раном имунском одговору код инфекције са *L. monocytogenes* (Naper и сар., 2011). Испитивање спроведено на мишевима инфицираним са *L. monocytogenes* показало је да је укупан број NK ћелија и њихових субпопулација у слезини био веома смањен код инфицираних Se-дефицитних мишева у односу на Se-адекватну контролу, потврђујући изостанак ефикасног одговора NK ћелија на инфекцију у условима дефицита селена. У истом огледу је и ниво цитолитичке активности NK ћелија слезине био значајно нижи код Se-дефицитне групе у односу на Se-адекватну контролу, што указује на компромитован урођени одговор организма на инфекцију услед дефицита селена (Wang и сар., 2009).

### **2.2.3. Утицај селена на компоненте стеченог имунитета – Б и Т лимфоците**

#### **2.2.3.1. Б лимфоцити и синтеза антитела**

Већина испитивања доступних у литератури разматра утицај статуса селена на функционалне капацитете хуморалног имунитета, док испитивања усмерена на заступљеност популације Б ћелија нису присутна у значајној мери.

У раним огледима, спроведеним на лабораторијским животињама, као имуноген су најчешће коришћени овчији еритроцити (SRBC). Испитивања примарног и секундарног хуморалног имунског одговора на SRBC показала су да је давање натријум селенита узроковало пораст титра IgM (Spallholz и сар., 1973a) и IgM и IgG антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита код мишева (Spallholz и сар., 1973b). Koller и сар. (1986) су код надокнаде селена

забележили супримиран секундарни имунски одговор (IgG) пацова на KLH (енг. *Keyhole Limpet Hemocyanin*), након двократне имунизације.

Са друге стране, Mulhern и сар. (1985) испитују утицај дефицита селена на хуморални имунски одговор. Селендефицитна исхрана (0,00 ppm) током 4 недеље код прве генерације мишева није узроковала редукован *in vivo* и *in vitro* IgM одговор на SRBC, одређиван на основу PFC (енг. *Plaque Forming Cell Response*), али је титар IgG био редукован у односу на селенадекватну (0,25 ppm) контролу. У истом огледу је код друге генерације селендефицитних мишева, изложених дефициту током ембрионалног развоја, периода сисања и током 5 недеља након одлучивања, *in vivo* забележен редукован IgG, али и IgM одговор у односу на контролне мишеве, са резултатима потврђеним и *in vitro*. Редуковани хуморални имунски одговор је објашњен незрелошћу имунског система, утицајем дефицита селена на матурацију и диференцијацију Б ћелија или дефектом Т ћелија укључених у одговор на овај тип антигена (Mulhern и сар., 1985).

Код домаћих животиња су забележени различити ефекти надокнаде и дефицита селена на популацију Б ћелија и хуморални имунски одговор. Нутритивни дефицит селена код пилића, постигнут исхраном са 0,0342 ppm селена током 42 дана почевши од 1. дана старости, утицао је негативно на развој *B. Fabricii* и узроковао заустављање ћелијског циклуса и повећану апоптозу ћелија бурзе у односу на селенадекватну контролу (0,2 ppm); титар серумских имуноглобулина овде није праћен (Peng и сар., 2011).

Код бројлера којима је селен даван кроз храну у најнижој препорученој (0,15 ppm) и прекомерној дози (0,45 ppm), у органском и/или неорганском облику током 6 недеља након излегања, није установљена разлика између група у хуморалном одговору на SRBC или NDV (*Newcastle Disease Virus*) имуноген (Funari и сар., 2012). Wang и сар. (2016) су испитивали утицај различитих доза и облика селена (DL селенометионин и натријум селенит) додаваних током 42 дана у основну храну са 0,04 ppm Se, на вредности титра IgM, IgG и IgA у серуму бројлера почевши од 7. дана старости. Додавање селена је довело до значајног пораста концентрација IgG, IgM и IgA у серуму, са вишим концентрацијама постигнутим код примене органског селена и

значајно вишим нивоом IgM и IgA у групи којој је додавана средња величина дозе (0,15 ppm) у односу на остале групе у огледу, при чему су бољи резултати забележени код примене DL селенометионина. Истовремено је забележен и виши титар Т3 и смањен однос Т4/Т3 у серуму.

Исхрана дефицитна у селену (0,03 ppm) је утицала на хуморални имунитет код телади која је двократно интраназално инфицирана вирусом инфективног ринотрахеитиса (IBRV), са забележеним вишим титром укупних IgM у селенадекватној групи (0,2 ppm), док статус селена није утицао на титар IgG мерен након секундарне инокулације вируса (Reffett и сар., 1988a). Титар специфичних анти-IBRV антитела у серуму је 14 дана након друге инокулације био виши у Se+ него у Se- групи (Reffett и сар., 1988a). Сличан ефекат је забележен код јагњади двократно вештачки инфициране вирусом параинфлуенце 3, код које је испитиван утицај селена и витамина Е самостално и у комбинацији (Reffett и сар., 1988b).

Анализом резултата из бројних радова у којима је испитиван утицај дефицита или суплементације селена, уочава се да његов ефекат на хуморални имунски одговор (пре свега у испитивањима суплементације) није конзистентан и да зависи од различитих фактора, укључујући узраст и врсту животиње; врсту антигена коришћеног у испитивању (Turner и Finch, 1991; Marsh и сар., 1981); величину примењене дозе и хемијски облик селена (Wang и сар., 2016), као и претходни нутритивни статус јединке (Bunglavan и сар., 2014). Ефекат суплементације селена на продукцију специфичних антитела не прати увек иста промена у нивоу укупних имуноглобулина истог изотипа и селен не мора на исти начин деловати на различите изотипове имуноглобулина (Finch и Turner, 1996). Овакви резултати не изненађују када се има у виду да селен кроз различите механизме може да делује на компоненте укључене у хуморални имунски одговор, затим сложеност међусобних интеракција регулаторних и ефекторских ћелија имунског система, као и комплексност и различитост самих имуногена коришћених у испитивањима. При процени утицаја на хуморални имунски одговор свакако треба имати у виду врсту антигена (Т-зависни или Т-независни) и утицај селена на Т лимфоците, односно популацију Th ћелија укључену у активацију Б лимфоцита и утицај

нивоа селена на усмеравање диференцијације наивних помоћничких (Th) ћелија у одређени фенотип. Једно од објашњења стимулишућег дејства селена на имунски одговор је да селен појачава способност лимфоцита да одговоре на цитокин IL-2 повећањем експресије IL-2 рецептора на лимфоцитима, што доводи до повећања њиховог броја, уз повећање цитотоксичности NK ћелија и повећану продукцију антитела код Б лимфоцита (Rooke и сар., 2004). Односно, повећањем експресије високоафинитетног IL-2 рецептора на Th лимфоцитима, подстиче се активност Б лимфоцита и продукција антитела. Забележено је и да статус селена утиче на бројност и однос популација и субпопулација лимфоцита у слезини (Mulhern и сар., 1985; Huang и сар., 2012), што може бити једно од објашњења за измењени хуморални одговор у условима његовог дефицита.

#### **2.2.3.2. Т лимфоцити**

Статус селена утиче на број и процентуалну заступљеност субпопулација Т лимфоцита, њихове пролиферативне капацитете у одговору на митоген и ефекторске функције, али су механизми којим се то остварује само делимично објашњени.

Функција селенопротеина у Т-посредованом имунском одговору испитивана је на мишевима са циљаном делецијом Sec tRNA[Ser]Sec гена у овој популацији ћелија. Утврђено је да су тимус, слезина и лимфни чворови код мишева са делецијом селенопротеина у Т ћелијама (*ΔtrspT*) били умерено до благо атрофични у односу на контролу; маса и целуларност тимуса, слезине и лимфних чворова су били смањени на 50 и 80% контролних вредности. Такође, заступљеност CD3+ популације ћелија у слезини је била смањена за 50% у односу на контролу (Shrimali и сар., 2008). Ефекат дефицита селена на број лимфоцита и масу тимуса и слезине испитиван је и кроз две генерације мишева у већ описаном огледу Mulhern и сар. (1985). Маса тимуса и слезине и број лимфоцита у слезини се нису разликовали у првој генерацији, али је друга генерација на селендефицитној исхрани имала мању масу слезине и број лимфоцита у односу на селенадекватну контролу (0,25 ppm), при чему је

смањење броја лимфоцита било пропорционално смањењу масе слезине и телесне масе. У огледу Vega и сар. (2007), и дефицитаран и унос селенометионина у вишку (0,02 ppm и 2 ppm) су за резултат имали смањен укупан број спленоцита, али нису утицали на релативну масу тимуса и слезине код женки мишева. У овом испитивању је забележено повећање релативне заступљености популације Т ћелија слезине у обе групе са измењеним уносом селена, које је објашњено као последица изражене редукције на нивоу популације Б лимфоцита.

Дефицит селена и селенопротеина утичу на пролиферацију Т ћелија. Kiremidjian-Schumacher и сар. (1990) описују смањену пролиферацију спленоцита миша у одговору на митогене након селендефицитне исхране (0,02 ppm) током 8 недеља и објашњавају је смањеном експресијом рецептора за IL-2 (Kiremidjian-Schumacher и сар., 1992). У испитивању Shrimali и сар. (2008), делеција селенопротеина је за последицу имала дефект у развоју функционално зрелих Т лимфоцита и њиховој TCR-зависној активацији. Испитивање стварања ROS показало је да је пре стимулације ниво створених ROS виши у *AtrspT* него у контролним ћелијама. Аутори закључују да губитак експресије селенопротеина резултира хиперпродукцијом ROS пре активације и смањењем пролиферације Т ћелија, односно да су селенопротеини кључни за контролу продукције ROS и контролу инхибишућег деловања повишених нивоа ROS. Са друге стране, Vega и сар. (2007) повећан ниво ROS код селендефицитних Т лимфоцита описују као додатни (стрес) сигнал и позитиван импулс за пролиферацију након стимулације конкавалином А, па је код ових ћелија забележен бољи пролиферативни одговор на митоген у односу на селенадекватну контролу.

Према Huang и сар. (2012), активација транскрипционог фактора NF-κB је и код Т лимфоцита кључни редокс механизам помоћу ког селен стимулише њихову активацију.

Да статус селена утиче на активацију, пролиферацију и диференцијацију наивних (девичанских) Т ћелија током започињања имунског одговора потврђују и Hoffman и сар. (2010). У њиховом огледу је уочена разлика у TCR - посредованој сигнализацији код CD4+ Т лимфоцита мишева храњених

дефицитном (0,08 mg/kg), адекватном (0,25 mg/kg) или храном са вишим садржајем селена (1,0 mg/kg) током 8 недеља. Виши унос селена је значајно повећао пролиферативни капацитет Т лимфоцита, мобилизацију калцијума, оксидативни прасак и транслокацију NFAT (нуклеарни фактор активираних Т ћелија) *in vitro*. Уочена је и повећана експресија IL-2 и високоафинитетног ланца IL-2 рецептора у групи са највишим садржајем селена у односу на остале групе. У испитиваним ћелијама није уочена разлика у нивоу ROS пре активације, док је ниво слободних тиола у селендефицитној групи био умањен у односу на друге групе. Стога ови истраживачи претпостављају да селен остварује свој ефекат модулирањем нивоа слободних тиола и специфичне сигнализације током активације CD4+ ћелија и да тако утиче на њихову пролиферацију и диференцијацију. Виши унос селена такође резултира скретањем ка Th1 фенотипу (Hoffmann и сар., 2010), јер изгледа да виши редуктивни статус фаворизује Th1 диференцијацију Т лимфоцита (Norton и Hoffmann, 2012).

Један од најјаснијих ефеката селена на лимфоците је већ описана појачана експресија IL-2 рецептора на површини ћелија и стимулација митогенима индуковане пролиферације Т лимфоцита (Roy и сар., 1993; Roy и сар., 1994).

Иако селендефицитне лимфоците генерално карактерише смањен степен пролиферације у одговору на различите митогене (Sheffy и Schultz, 1978; Parnham и сар., 1983; Eskew и сар., 1995), исто тако и суплементација селеном у високим дозама може имати инхибишући утицај на пролиферацију лимфоцита (Nair и Schwartz, 1990; Stabel и сар., 1990), што указује на значај адекватног снабдевања селеном за нормалан рад имунског система.

### **2.3. Хормони тиреоидне осовине**

Неуроендокрини систем директно и индиректно утиче на развој и функције имунског система, а све је више доказа да и имунски систем утиче на активност ендокриног система, укључујући тиреоидну осовину (Fabris и сар. 1995; Klein, 2006). Двосмерна комуникација између неуроендокриног и имунског система је посредована хормонима и другим сигналним молекулима и резултат је присуства рецептора за исте лиганде у ћелијама оба система (Blalock, 1992).

Тиреоидни хормони делују на практично све ћелије у организму и есенцијални су за нормалан раст, развој, диференцијацију и метаболизам (Lazar, 1993; Yen, 2001). Иако је њихов модулаторни утицај на имунски систем потврђен, разумевање овог односа је и даље непотпуно, како због сложености појединачних система тако и због сложености њихових међусобних интеракција, па су резултати испитивања често компликовани за интерпретацију, или наводе на контрадикторне закључке (De Vito и сар., 2011).

#### **2.3.1. Тиреоидни хормони и селен**

Синтеза тиреоидних хормона у штитастој жлезди је првенствено регулисана системом негативне повратне спреге који обухвата хипоталамус, хипофизу и тиреоидну жлезду (НРТ осовина). Тиреостимулирајући хормон (TSH) је основни регулатор ослобађања и секреције тиреоидних хормона (Yen, 2001). Поред TSH и фактора који регулишу његову синтезу и секрецију, најзначајнији фактор у синтези тиреоидних хормона је расположивост јода.

Дуго је познат и значај селена за тиреоидну функцију. Тиреоидна жлезда садржи више селена по граму ткива него било који други орган (Dickson и Tomlison, 1967). Есенцијални значај селена потврђује чињеница да се тиреоидна жлезда и метаболизам тиреоидних хормона налазе хијерархијски високо на лествици селен-зависних ензима и ткива (Schomburg и сар., 2006). Иако активни хормон Т3 настаје и директном синтезом у тиреоидној жлезди, највећи део Т3 настаје ензимском дејодинацијом спољашњег прстена Т4 у



периферним ткивима. Особине и улога дејодиназа, селеноензима који су укључени у доминантни пут активације и инактивације тиреоидних хормона, описани су у поглављу 2.1.1.3.2. Треба напоменути да поред дејодинације, метаболизам тиреоидних хормона обухвата и мање значајне путеве глукуронидације и сулфатације, који у специфичним условима могу бити више укључени (Peeters и Visser, 2017).

### **2.3.2. Механизми деловања тиреоидних хормона**

Биолошка активност тиреоидних хормона је највећим делом одређена унутарћелијском концентрацијом Т3, која зависи од концентрације Т3 и прохормона Т4 у циркулацији, активности дејодиназа које катализују продукцију Т3 (D1 и D2) или његову разградњу (D1/D3), и активности транспортера који посредују у уласку или изласку Т3 или Т4 из ћелије. Тиреоидни хормони своје физиолошке улоге остварују кроз геномске и негеномске механизме. Класични, геномски ефекти тиреоидних хормона се остварују везивањем за специфичне рецепторе у једру (Yen и сар., 2006). Тиреоидни рецептори (TR) су чланови суперфамилије једарних рецептора који делују као индуцибилни транскрипциони фактори (Laudet и сар., 1992), а њихов природни лиганд је Т3. У одсуству лиганда, TR су везани за тзв. корепресорске протеине који инхибирају позитивно регулисану транскрипцију циљних гена (Chen и сар., 1995.; Horlein и сар., 1995). Након везивања Т3 за рецептор, долази до отпуштања корепресора и везивања коактиватора за комплекс TR-лиганд, што за последицу има активацију транскрипције (Kress и сар., 2009). Поред активације, резултат везивања Т3 за TR може бити и инхибиција транскрипције неких гена, какав је нпр. ген који кодира синтезу TSH (Lazar, 2003). Присуство тиреоидних рецептора у ћелијама имунског система је потврђено (Csaba и сар., 1977; Segal и Ingbar, 1982; Villa-Verde и сар., 1992). Иако и Т4 може деловати посредством тиреоидног рецептора, његов афинитет за везивање Т4 је значајно мањи. Односно, у геномском концепту деловања хормона, Т4 представља прохормон из ког деловањем ткивних дејодиназа настаје биолошки активнији хормон Т3 (Davis и сар., 2008).

Поред геномских ефеката којима се објашњава највећи број познатих функција тиреоидних хормона, постоје бројни негеномски ефекти који се развијају брже него они посредовани везивањем за тиреоидне рецепторе и на које не утичу инхибитори транскрипције и синтезе протеина. У ћелијској мембрани је идентификован интегрин  $\alpha\beta_3$ , структурни протеин који има домен за везивање јодотиронина и присутан је практично на свим ћелијама (Vergh и сар., 2005; Davis и сар., 2005). На овом рецептору је препознато место за везивање Т3, као и место за деловање Т3 и Т4 (Lin и сар., 2009). Посредством овог интегринског рецептора, покрећу се или модулирају комплексни ћелијски процеси као што су унутарћелијски промет протеина, миграција ћелија какве су неуронске и глија ћелије, агрегација тромбоцита, пролиферација ћелија (ангиогенеза) (Cheng и сар., 2010). Поред ћелијске мембране, описани су и протеини у цитоплазми који везују јодотиронине, и то су или нуклеарни рецептори који се привремено налазе у цитоплазми или цитоплазматски протеини (Cheng, 2000). Кроз негеномске механизме Т4 може остварити своје биолошке ефекте без претходне конверзије у Т3 (Davis и сар., 2006).

### **2.3.3. Антитиреоидни лекови**

Неконтролисана продукција тиреоидних хормона која доводи до хипертиреоидизма може се регулисати применом антитиреоидних лекова, који спречавају синтезу тиреоидних хормона и/или смањују конверзију Т4 у Т3.

Пропилтиоурацил (6-n-propyl-2-thiouracil, PTU), уз метимазол и карбимазол, спада у тионамидне лекове и користи се још од четрдесетих година XX века у терапији хипертиреоидизма. Главни ефекат PTU је инхибиција синтезе тиреоидних хормона у тиреоидеји, блокирањем процеса јодинације тиреоглобулина који је посредован тиреоидном пероксидазом (ТРО) (Engler и сар., 1983). Поред тога, PTU инхибира ензим D1 који конвертује Т4 у Т3 (Cooper, 2000). Пропилтиоурацил и други тионамиди се повезују са имуномодулаторним деловањем, јер се код пацијената са аутоимуним болестима тиреоидне жлезде који користе ове лекове у терапији, бележе

дуготрајне ремисије (Franklyn, 1994). Према Volpe (2001) имуномодулаторни ефекти антитиреоидних лекова су секундарни и остварују се индиректно, првенствено деловањем на тиреоците, тачније на продукцију тиреоидних хормона. Јопаноична киселина је средство за холецистографију које омета периферни метаболизам тиреоидних хормона (Bürgi и сар., 1976). Ова киселина богата јодом блокира конверзију Т4 у Т3 и rТ3 у Т2 компетитивном инхибицијом дејодиназа D1 и D2 (Braga и Cooper, 2001), али представља и супстрат за D1 (Steinsapir и сар., 2000; Renko и сар., 2012). Поред тога, јод ослобођен у метаболизму ове киселине може да блокира тиреоидну секрецију хормона (Braga и Cooper, 2001).

Јопаноична киселина можда утиче и на транспорт тиреоидних хормона у ћелију, што је показано на хепатоцитима *in vitro* (Westholm и сар., 2009). Како брже и ефикасније него конвенционални антитиреоидни лекови може да редукује ниво Т3 у серуму, јопаноична киселина се користи у терапији израженог хипертиреоидизма, тиреотиоксичне кризе или у припреми за тиреоидектомију (Lizcano и Salvador, 2008).

Антитиреоидни лекови се у циљу истраживања користе за експерименталну индукцију хипотиреоидизма.

#### **2.4. Хормони тиреоидне осовине и имунитет**

Интеракцију хормона НРТ осовине и имунског система потврђује експресија специфичних рецептора у различитим ћелијама имунског система, као и чињеница да се флукуације у нивоу хормона одражавају на имунски статус. Хормони НРТ осе могу имати директан утицај на одређене популације имунских ћелија или свој ефекат могу остварити посредно, деловањем на друге ћелијске и/или хуморалне факторе који имају имуномодулаторно дејство.

*Испитивања на анималним моделима са генетски условљеним дефицитом тиреоидних хормона или тиреоидних рецептора*

Утицај ендокриног на развој и функцију имунског система је проучаван у испитивањима на животињама са генетски условљеним дефицитом хормона.

Код соја мишева са конгениталном хипофункцијом аденохипофизе („*snell dwarf*“), забележена је генерализована хипотрофија лимфатичног ткива, са смањеном апсолутном и релативном масом тимуса и смањеном целуларношћу у односу на контролне животиње, која је била најизраженија у узрасту када тимус достиже максимални развој (Fabris и сар., 1971). Апсолутна и релативна маса периферних лимфатичних ткива, слезине и лимфних чворова, такође су биле мање него код контролних животиња, са хистолошким налазом редукције броја и величине лимфних фоликула и смањеном целуларношћу, посебно у тимус-зависним зонама (Fabris и сар., 1971). Такође је био редукован број ћелија костне сржи, са највећим смањењем броја моноклеарних ћелија (Martinazzi и Giraldi, 1962). *Snell dwarf* (dw/dw) мишеве карактерише и супримиран развој Б лимфоцита (Montecino-Rodriguez и сар., 1996). Када су у питању ефекторске функције имунског система, код ових јединки постоји добар, али редукован и за 24-48 сати одложен примарни хуморални имунски одговор на антиген овчијих еритроцита (SRBC) у односу на контролу, док у секундарном имунском одговору на SRBC између *Snell dwarf* и нормалних јединки нема значајне разлике, као ни разлике у укупном нивоу имуноглобулина или заступљености појединих класа имуноглобулина (Fabris и сар., 1971). Ћелијски посредован имунитет, процењиван у реакцији одбацивања калема, код овог соја мишева је дефицитан (Fabris и сар., 1971). Надокнада соматотропног хормона и/или тироксина код *Snell dwarf* јединки резултира враћањем капацитета и обнављањем хистолошке структуре и целуларности лимфатичних ткива (Piergoli и сар., 1969). Надокнада тироксина враћа број пре-Б лимфоцита костне сржи на вредности које су упоредиве или су изнад вредности забележених код контролних животиња, што указује на значај хормона тиреоидне осовине за Б лимфопоезу. Међутим, за обнављање њихове

функције код овог соја мишева неопходна је и примена соматотропног хормона (Montecino-Rodriguez и сар., 1996).

Значај тиреодних хормона за развој имунског система и имунски одговор испитиван је и на сојевима мишева са генским дефектом експресије хормона или дефектом експресије њихових рецептора, односно код сојева *hyt/hyt* (мишеви са мутацијом *hyt* гена и веома ниским, до испод прага детекције, нивоом серумског Т4 (Beamer и сар., 1981; Biesiada и сар., 1996)) и  $TR^{-/-}$  мишева (мишеви са циљаним оштећењем TR). Према Montecino-Rodriguez и сар. (1997) и Dorshkind и Horseman (2000) стварање Т ћелија је код *hyt/hyt* мишева непромењено, а индекс целуларности тимуса и заступљеност CD4 и CD8 популације су упоредиви са контролом. За разлику од наведених аутора, Erf (1993) описује да је код *hyt/hyt* мишева број CD8<sup>+</sup> тимоцита за око 25% мањи у односу на вредности у еутиреоидној контролној групи и да је последично измењен однос тимусних CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> субпопулација. Сличне промене су забележене и у слезини, уз смањење њене масе у односу на еутиреоидне јединке.

Код јединки са делецијом рецептора *T3Ra* утврђена је слабија пролиферација прекурсора Т лимфоцита и редукција броја тимоцита, без промене међусобног односа субпопулација Т лимфоцита у тимусу. Број Т лимфоцита слезине је такође био редукован у односу на контролу за око 30%, са непромењеним односом CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> субпопулације (Arpin и сар. 2000). Притом, развој Т ћелија није зависио од експресије *T3Ra* у самим тимоцитима, па промене код *T3Ra*<sup>-/-</sup> мишева ови аутори објашњавају утицајем делеције *T3Ra* на другим нивоима, каква је микросредина тимуса, односно утицајем Т3 на продукцију IGF-1 (енг. *Insulin-like Growth Factor*), хормон раста (GH; енг. *Growth Hormone*) и тимулин у самом тимусу. Fabris и сар. (1986) потврђују да тиреоидни статус утиче на ендокрине функције тимуса.

Код оба соја мишева је потврђен значај тиреоидних хормона за развој Б лимфоцита. Делеција *T3Ra* је довела до редукције броја Б-лимфоцита у костној сржи за око 20% и то пре свега популације про/пре-Б ћелија, а број Б лимфоцита слезине је био мањи за око 60% у односу на контролну групу (Arpin и сар., 2000). Даља испитивања ових аутора подржавају хипотезу да је код Б

лимфоцита, за разлику од Т лимфоцита, ћелијски *T3Ra* директна мета деловања тиреодних хормона, иако аутори не искључују и ефекат делеције рецептора на факторе микросредине. Dorshkind и Horseman (2000) закључују да је дефицит Б ћелија последица изостанка позитивног утицаја тиреодних хормона на пролиферацију популације про-Б лимфоцита. Као могуће објашњење наводе изостанак од тиреоидних хормона зависне експресије протеина потребних за прогресију ћелијског циклуса у Б лимфопоези, активну репресију транскрипције гена код хипотиреозе (услед дефицита лиганда за TR) и диференцијалну регулацију експресије TR која резултира различитом регулацијом индукције и/или репресије транскрипције гена у ћелијама Б лозе. И према испитивању Montecino-Rodriguez и сар. (1997) поремећај у продукцији Б лимфоцита код дефицита тиреоидних хормона настаје на ћелијама које су већ опредељене за Б лимфопоезу.

Функционална испитивања имунског система показују да, иако је код *hwt/hwt* мишева установљен значај тиреоидних хормона за Б лимфопоезу, није уочен измењен хуморални одговор на Т-зависне и Т-независне антигене (Foster и сар., 2000). Такође, није забележен ни утицај на ћелијски посредован имунски одговор. Аутори ове студије закључују да тиреоидни хормони нису неопходни за нормалну функцију Т и Б лимфоцита, односно развој стеченог имунског одговора, док њихова улога у урођеном имунитету захтева даља испитивања.

Испитивања утицаја хипотиреозе која је експериментално изазвана уклањањем штитасте жлезде или применом антитиреоидних лекова, углавном су истовремено разматрала морфолошке и функционалне промене на нивоу имунског система, а преглед добијених резултата је приказан даље у тексту у оквиру посебних поглавља која разматрају утицај измењеног нивоа тиреоидних хормона на појединачне компоненте имунског система.

### *Улога TSH и TRH*

Поред индиректног деловања преко утицаја на синтезу хормона штитасте жлезде, експресија рецептора за TSH и продукција TSH у ћелијама имунског система указују и на његову директну улогу у контроли имунских

функција (Pawlikowski и сар., 1994). Литература описује да TSH могу да произведу Т лимфоцити, Б лимфоцити, дендритичне ћелије слезине, хематопоетске ћелије костне сржи, лимфоцити и епителне ћелије црева (Smith и сар., 1983; Kruger и сар., 1989; Klein и сар., 2006). Klein (2006) наводи да у регулацији имунитета TSH може деловати аутокринно или паракринно, као цитокин имунског система. Исти аутор описује значајно повећање производње TSH у маргиналним зонама слезине и лимфних чворова након стимулације антигеном. Рецептор за TSH (TSHr) је присутан у тимусу (Dutton и сар., 1997; Paschke и Geenen, 1995), укључујући ретикулоепителне ћелије значајне за развој Т лимфоцита (Bodey и сар., 2000). Испитивања експресије TSHr на ћелијама периферног имунског система указују на његову селективну и диференцијалну експресију на популацијама различитих ћелија и субпопулацијама истог типа ћелија (Klein, 2003; Coutelier и сар., 1990; Chabaud и Lissitzky, 1977; Bagriacik и Klein, 2000). Према van der Weerd и сар. (2014), експресија TSHr је углавном ограничена на развојне облике Т лимфоцита тимуса, где висок ниво његове експресије указује на функционални значај TSH сигнализације током развоја ових ћелија; претпоставка аутора је да је лиганд за ове рецепторе хипофизни TSH. У *in vitro* испитивањима TSH је показао дозно зависну стимулацију продукције антитела на овчије еритроците (Blalock и сар., 1984). Coutelier и сар. (1990) такође *in vitro* показују директно дејство TSH на Б лимфоците и дозно зависни утицај на митогеном активiranу пролиферацију хуманих Т и Б лимфоцита, са инхибишућим ефектом високих концентрација. Значај TSH за имунски одговор показује и то да је примена антиTSH серума код младих *Charles River* пацова довела до инволуције тимуса и/или слезине, што је било нарочито изражено у кортексу тимуса, тимус зависним зонама слезине и перифоликуларном лимфоцитном омотачу (Pierpaoli и сар., 1969). Имуномодулаторно дејство TSH на активност NK ћелија се огледа у појачању ћелијског одговора на стимулацију цитокином IL-2 (Provinciali и сар., 1992), вероватно кроз повећање броја IL-2 рецептора на овим ћелијама (Provinciali и Fabris, 1991).

Трипептид хипоталамуса, TRH, дејство на имунски систем може да остварује директно преко TRH рецептора и индиректно, подстицањем

ослобађања других супстанци са имуномодулативним деловањем, какав је TSH (Kamath и сар., 2009). Експресија TRH гена је установљена у лимфатичним органима, тимусу и слезини (Montagne и сар., 1999). Рецептори за TRH су присутни у тимусу, костној сржи и лимфатичним ткивима (Sun и сар., 2003), спленоцитима пацова (Raiden и сар., 1995), на тонзиларним Т и Б лимфоцитима и моноцитима периферне крви човека (Mellado и сар., 1995). Према Kamath и сар. (2009), TRH и TRHг постоје и функционишу и као аутокрини/паракрини систем у оквиру имунског система и других периферних ткива.

#### **2.4.1. Утицај тиреоидних хормона на компоненте урођеног имунитета – макрофаге и НК ћелије**

##### **2.4.1.1. Макрофаги**

Макрофаги се могу налазити као резидентне ћелије у ткивима или могу настати из моноцита, а њихове функције зависе од диференцијације у различите функционалне фенотипе који се, опет, развијају под утицајем различитих стимулуса из локалног окружења. Различити функционални фенотипи макрофага се најгрубље могу поделити на класично активирани (M1) и алтернативно активирани (M2) макрофаге, иако они представљају два екстрема између којих се *in vivo* налазе различите субпопулације макрофага. У литератури су описане и друге субпопулације перитонеалних макрофага које се издвајају по свом пореклу, карактеристикама и улогама у различитим физиолошким и патофизиолошким процесима. Тако је код макрофага перитонеалне дупље мишева установљено присуство две доминантне субпопулације ових ћелија са различитим фенотипским, функционалним и развојним карактеристикама: LPM (енг. *large peritoneal macrophages*) и SPM (енг. *small peritoneal macrophages*) (Ghosh и сар., 2010). Код нестимулисаних јединки, тј. у условима мировања, LPM представља доминантну субпопулацију макрофага (око 90%), која се обнавља углавном локалном пролиферацијом (Yona и Jung, 2010). Инфламаторни агенси резултују миграцијом моноцита периферне крви и њиховом диференцијацијом у макрофаге (Yona и Jung, 2010).



Тако је, на пример четири дана након интраперитонеалне инјекције тиогликолата, у перитонеалној дупљи мишева доминантна SPM субпопулација макрофага настала из моноцита крви (Ghosn и сар., 2010).

Тиреодни хормони могу да утичу на заступљеност ових субпопулација, диференцијацију и поларизацију макрофага и њихове миграторне капацитете. Према Perrotta и сар. (2014) хормон Т3 утиче на фенотип и функцију макрофага и то посредством тиреоидних рецептора, односно деловањем кроз геномске механизме. У *in vitro* условима, Т3 у концентрацијама које обезбеђују максималну заузетост рецептора негативно утиче на диференцијацију моноцита у макрофаге и усмерава диференцијацију неполаризованих макрофага у М1 фенотип. У истом истраживању забележено је да је код хипотиреоидних пацова у перитонеалној дупљи више заступљена SPM субпопулација, с тим да је интраперитонеална примена Т3 поништила овај ефекат хипотиреозе. Према хипотези аутора, након изазивања инфламације применом липополисахарида (LPS), Т3 негативно утиче на регрутовање нових ћелија из циркулације (SPM) утицајем на њихову диференцијацију и миграцију, и подстиче пролиферацију резидентних ћелија (LPM), што је можда начин на који Т3 спречава развој системског инфламаторног одговора код ендотоксемије.

Хормонска регулација активности антиоксидативних ензима макрофага је посебно значајна када се узме у обзир да су код ових ћелија оксидативни метаболизам и функција блиско повезани и да све промене у активности ензима последишно могу утицати на инфламаторни и имунски одговор (Pereira и сар., 1995). Ови аутори потврђују модулационо дејство тиреоидних хормона на активност антиоксидативних ензима и продукцију пероксида код макрофага. Испитивање је спроведено на перитонеалним резидентним макрофагима пацова који су 50 дана раније били подвргнути тиреоидектомији или третирани са Т3 и Т4, у циљу постизања хипо- односно хипертиреоидног статуса. Према резултатима ове студије, хипотиреоидизам је смањио активност супероксид-дисмутазе макрофага за 38%, каталазе за 34% и глутатион пероксидазе за 29%, док су тиреоидни хормони у вишку повећали активност SOD за 210%, али смањили активност GPx за 68%. Такође су забележене промене у продукцији

водоник пероксида у односу на контролу, са редукцијом за 50% и у хипо- и у хипертиреоидном статусу. Costa Rosa и сар. (1995) су такође испитивали утицај хипо- и хипертиреоидизма на функцију перитонеалних макрофага. Активација применом BCG (*Bacillus Calmette–Guérin*) је код макрофага пореклом од јединки које су 50 дана раније биле подвргнуте тиреоидектомији, узроковала значајно већу продукцију водоник пероксида (у присуству и одсуству PMA) у односу на резидентне макрофаге, односно одговарајућу еутиреоидну контролну групу. Насупрот томе, код тиогликолатом индукованих (инфламаторних) перитонеалних макрофага продукција  $H_2O_2$  се није значајно разликовала од контроле. Хипотиреоза је узроковала повећање фагоцитних капацитета код инфламаторних и код BCG-активираних макрофага, али није утицала на миграцију ћелија у перитонеалну дупљу (Costa Rosa и сар., 1995). Liu и сар. (1993) описују да су тиогликолатом индуковани перитонеални макрофаги пореклом од мишева код којих је хипотиреоза изазвана применом антитиреоидног лека метимазола у трајању од 4 недеље, продуковали мање ROS ( $O_2^-$ ) него перитонеални макрофаги контролних животиња након инкубације са PMA (енг. *phorbol 12-myristate 13-acetate 4-O-methyl ether*), као и смањење функционалних капацитета макрофага у хипотиреози. Уочени ефекат је објашњен утицајем смањеног нивоа тиреоидних хормона, иако они нису директно одређивани.

#### 2.4.1.2. NK ћелије

Лимфокин IL-2 и IFN представљају важне факторе у регулацији активности NK ћелија (Provinciali и Fabris, 1991). Ове ћелије у мировању експримирају рецептор за IL-2 и одговарају на IL-2 без претходне стимулације антигеном, а активација посредована овим интерлеукином доводи до појачања њиховог цитотоксичног деловања (Yu и сар., 2000). Интерферон (IFN) типа I је рани регулатор броја и активације NK ћелија и њихове антитуморске активности (Swann и сар., 2007).

Sharma и сар. (1982) наводе да примена хормона T4 и T3 код мишева, у одређеном опсегу доза, стимулише цитолитичку активност перитонеалних NK

ћелија и NK ћелија слезине у *in vitro* тесту на YAC-1 ћелијској линији, без претходно забележене промене нивоа интерферона у серуму мишева. Provinciali и Fabris (1990) показују да је *in vitro* одговор NK ћелија слезине на IFN појачан када су оне претходно инкубирани са T4 или T3 у физиолошким, па и у субфизиолошким серумским концентрацијама. Овај стимулациони ефекат аутори објашњавају повећаном експресијом рецептора за IFN на површини ћелије под утицајем тиреоидних хормона. Provinciali и сар. (1991) наводе да између младих и старих BALB/c мишева постоји значајна разлика (50-60%) у нивоу T3 и T4 у серуму. Примена T4 код старих јединки доводи до значајног повећања активности NK ћелија, док код младих јединки овај ефекат изостаје. Тироксин *in vitro* обнавља осетљивост спленоцита старих мишева на IFN и појачава IFN-индуковану цитотоксичност NK ћелија. Примена PTU *in vivo* је смањила одговор NK ћелија слезине на IFN, а прекид третмана омогућио обнављање IFN-ом индуковане цитотоксичности ових ћелија (Provinciali и сар., 1991).

Иако описани огледи указују на стимулациону улогу тиреоидних хормона у регулацији активности NK ћелија, она је забележена код физиолошких концентрација тиреоидних хормона или код апликације T4 јединкама са претходно ниским серумским нивоом ових хормона. Да тиреоидни хормони у физиолошком опсегу серумских концентрација позитивно утичу на NK ћелије потврђује директна позитивна корелација између броја NK ћелија у периферној циркулацији и концентрације T3 и слободног T4 (fT4) у серуму старијих особа (Mariani и сар., 1999). Са друге стране, хронично висок ниво тироксина је имао негативан утицај на активност NK ћелија периферне крви и слезина миша *in vitro* у огледу Stein-Streilein и сар. (1987).

Примена PTU у циљу индукције хипотиреозе имала је за последицу различите промене у апсолутном и релативном броју NK ћелија у лимфатичном ткиву, у зависности од узраста у ком је примењиван и дужине трајања третмана. Код новорођених пацова код којих је хипотиреоза изазвана давањем PTU (200 ppm) мајкама током лактације, забележено је значајно смањење броја NK ћелија након 22 дана третмана. Број NK ћелија

нормализован у односу на телесну масу, вратио се на ниво вредности контролне групе 6 дана након прекида примене PTU. Иако је апсолутни број NK ћелија био нижи, процентуална заступљеност ове популације спленоцита била је и остала повећана до 6. дана након прекида PTU третмана (Rooney и сар., 2003). У сличном огледу који је испитивао утицај развојног хипотиреоидизма на имунски систем, процентуална заступљеност популације NK ћелија у слезини пацова који су индиректно, током интраутериног развоја и кроз млеко мајки били изложени деловању PTU (12 ppm), такође је била већа него у контролној групи (Nakamura и сар., 2007). За разлику од наведеног, у већ описаном огледу Stein-Streilein и сар. (1987) након 6 недеља третмана тироксином односно пропилтиоурацилом (0,1%), између хипер-, хипо- и еутиреоидне групе одраслих мишева није забележена статистички значајна разлика у броју NK ћелија слезине, одређивана методом проточне цитометрије. Watanabe и сар. (1995) описују различите ефекте PTU у зависности од дужине трајања третмана. Примена PTU у концентрацији од 0,1% током 8 недеља није довела до промене процентуалне заступљености NK ћелија у слезини одраслих женки мишева у односу на еутиреоидну контролу, али је након дуготрајног третмана (32 недеље) забележено смањење процента ових ћелија у слезини и у периферном крвотоку. Дуготрајна хипертироксинемија је повећала процентуалну заступљеност NK ћелија у слезини. Насупрот томе, Volpe (2001) наводи да хипертиреозидизам код Грејвсове болести карактерише редукован број NK ћелија, а применом антииреоидних лекова, без обзира на величину дозе, коригује се ова и друге промене типичне за повишени ниво тиреоидних хормона код људи.

## **2.4.2. Утицај тиреоидних хормона на компоненте стеченог имунитета – Б и Т лимфоците**

### **2.4.2.1. Б лимфоцити и синтеза антитела**

Значај тиреоидних хормона за развој и пролиферацију популације Б ћелија је потврђен у испитивањима на јединкама са конгениталним дефицитом тиреоидних хормона или њихових рецептора, што је већ описано у уводном делу поглавља 2.4. Тиреоидни хормони су неопходни за нормалан развој и пролиферацију Б ћелија у костној сржи и свој ефекат остварују кроз регулацију пролиферације популације про-Б ћелија, али самостално не делују као про-Б митогени или кофактори пролиферације (Foster и сар., 1999). Надокнада тироксина код *Snell dwarf* соја мишева враћа проценат и апсолутни број Б лимфоцита костне сржи на вредности упоредиве са контролом (Montecino-Rodriguez и сар., 1996).

Измењени тиреоидни статус утиче на заступљеност и број Б ћелија и у периферним органима лимфатичног ткива. У огледу Watanabe и сар. (1995), примена PTU у циљу индукције хипотиреоидизма у концентрацији од 0,1% током 8 недеља није довела до промене у процентуалној заступљености Б ћелија у слезини хипотиреоидних јединки, а дуготрајни хипотиреоидизам узрокован применом PTU током 32 недеље довео је до повећања релативне заступљености и апсолутног броја Б лимфоцита слезине у односу на контролну еутиреоидну групу. За разлику од овог истраживања, други аутори бележе изражен супресивни утицај хипотиреозе на ову популацију ћелија. Rooney и сар. (2003) су пратили утицај хипотиреозе на имунски систем пацова током постнаталног развоја. Примена пропилтиоурацила у концентрацији 0,02% (200 ppm) код женки пацова током лактације, имала је највећи утицај на популацију Б лимфоцита слезине код потомства. Процентуална заступљеност популације Б ћелија је била смањена већ после две недеље третмана и остала редукована и б дана након прекида примене PTU. Поред релативне заступљености, били су смањени укупан број Б ћелија и број ћелија нормализован према телесној маси. Nakamura и сар. (2007) су испитивање утицаја хипотиреоидизма на имунски

систем проширили на период интраутериног развоја. Хипотиреоидни статус младунаца пацова је и овде индукован индиректно, давањем антитиреоидних лекова, PTU (3 ppm и 12 ppm) или метимазола - MMI (200 ppm) женкама почевши од 10 дана гестације и током 3 недеље лактације, до одлучења. Забележена је смањена процентуална заступљеност Б ћелија у слезини и периферној крви у односу на вредности контролне групе. Ohashi и Itoh (1994) такође описују да је хипотиреоидизам, експериментално изазван применом јода ( $^{131}\text{I}$ ), код одраслих пацова довео до смањења процента Б лимфоцита у слезини. Приказани подаци потврђују изражен утицај измењеног статуса тиреоидних хормона на популацију Б лимфоцита.

Када је у питању функција хуморалне гране имунитета у условима хипотиреозе, већ је наведено да хуморални имунски одговор на Т-зависне и Т-независне антигене није био измењен код *hyt/hyt* соја мишева са конгениталним дефицитом тиреоидних хормона (Foster и сар., 2000). Код *Snell dwarf* јединки забележен је смањен титар антитела у примарном одговору на SRBC антиген (Fabris и сар., 1971), а примена хормона раста (GH) и T4 су обновили ниво имунског одговора на вредности забележене код нормалних јединки (Pierpaoli и сар, 1969). Тиреоидектомија је код новорођених и младих пацова довела до смањења примарног хуморалног имунског одговора на овчије (SRBC) или пилеће еритроците (CRBC), а примена T4 до његовог обнављања (Fabris, 1973). У испитивању Vandyug и сар. (2003), смањена целуларност слезине је била праћена и супресијом примарног хуморалног имунског одговора на овчије еритроците, одређиваним 3,5 и 6 месеци након тиреоидектомије.

Са друге стране, примена пропиотиоурацила може имати супресивни или стимулативни ефекат на хуморални имунски одговор. Duarte и сар. (2003) описују да примена дозе PTU од 5 mg/200 g TM/дан код пацова у зависности од дужине третмана може стимулисати (8 или 16 дана) или инхибирати (30 и 90 дана) продукцију антитела на SRBC у примарном и секундарном имунском одговору. Друга група аутора (Kai и сар., 1988) утврђује различит ефекат PTU у зависности од величине примењене дозе. Примена PTU у концентрацији од 0,1% и 1% код младих пилића је довела до стимулације примарног и секундарног хуморалног имунског одговора на Т-зависан (SRBC) и Т-

независан антиген (*Brucella abortus*) који су одређивани након 5 недеља (IgM) и 7 недеља (IgG) третмана. Примена PTU у концентрацији од 5% имала је супресиван ефекат на продукцију антитела. У свим групама је забележена хипотиреоза, са нивоом редукције серумског нивоа хормона који је зависио од примењене дозе PTU. И у другом огледу ове групе аутора забележен је стимулативан ефекат ниских доза PTU (0,01-0,1%) након 4 недеље примене, на имунски одговор на SRBC антиген код младих пилића (Kai и сар., 1993).

Rooney и сар. (2003а) су код женки пацова током гравидитета и затим све до одлучења спроведеног 23. дана лактације, примењивали PTU у дози од 2mg/kg ТМ/дан. Код њиховог потомства није забележена разлика у примарном и секундарном хуморалном имунском одговору на SRBC у односу на контролну групу, одређивана у узрасту пацова од 8 (IgM) и 12 недеља (IgG), односно 5-8 недеља по завршетку примене PTU. Klecha и сар. (2000) описују да је примена PTU код еутиреоидних јединки значајно смањила титар алоантигених антитела и бележе обнављање имунског одговора након примене ТЗ.

Имуномодулациони ефекат PTU на имунски одговор може бити последица његовог деловања на активацију комплемента, како наводе Duarte и сар. (2000). Утврђено је да примена PTU утиче првенствено на алтернативни пут активације комплемента, у смислу повећања литичке активности комплемента у серуму пацова и до 180% од вредности забележене код контроле. Утицај на класични пут активације комплемента је мање изражен и иде у смеру инхибиције.

Резултати које су Wilson и сар. (1988) забележили у *in vitro* испитивању наводе ове ауторе на закључак о директном дејству PTU на ћелије имунског система. Ослобађање имуноглобулина IgM и IgG након стимулације са PWM (енг. *pokeweed mitogen*) је било значајно веће код периферних Б лимфоцита пореклом од хипертиреоидних него од еутиреоидних особа, а примена PTU у концентрацијама  $10^{-3}$  до  $10^{-7}$  M је довела до статистички значајне инхибиције ослобађања IgM и IgG код обе групе.

#### 2.4.2.2. Т лимфоцити

Тимус представља примарни орган имунског система у ком прогениторске ћелије пореклом из костне сржи подлежу процесу пролиферације и диференцијације/матурације у специфичној микросредини тимуса и настаје репертоар функционалних Т ћелија. Рецептори за Т3 се налазе у лимфоцитима тимуса и тимусним епителним ћелијама (Villa-Verde и сар., 1993). Тиреоидни хормони утичу на ендокрину активност тимуса (Savino и сар., 1984; Fabris и сар., 1986) и индиректно на матурацију Т лимфоцита. Csaba и сар. (2004) доказују присуство Т3 у лимфоцитима тимуса пацова, за који наводе да је можда локалног (екстратиреоидног) порекла и да производња и акумулација Т3 у лимфоцитима и његова паракрина/аутокринна секреција за циљ имају одржавање локалног нивоа Т3 у условима тиреоидне инсуфицијенције.

Дефицит хормона аденохипофизе код *Snell dwarf* соја мишева, како је већ описано, резултира смањењем масе и целуларности тимуса и секундарних лимфатичних органа (пре свега у тимус-зависним зонама), као и дефицитним ћелијски посредованим имунским одговором (Fabris и сар., 1971). У погледу утицаја конгениталног хипотиреоидизма на Т ћелије, литература наводи различите податке, од тога да код *hyt/hyt* соја мишева нема измена код ове популације лимфоцита (Montecino-Rodriguez и сар., 1997; Dorshkind и Horseman, 2000), до налаза смањеног броја тимоцита и спленоцита и повећаног односа CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т ћелија тимуса и слезине (Erf, 1993).

Тиреоидектомија доводи до инволуције тимуса, слезине и лимфних чворова. Када је изведена перинатално имала је израженији утицај на тимус него када је спроведена касније, док су без обзира на време уклањања тиреоидне жлезде забележене сличне промене на секундарним лимфатичним органима, слезини и лимфним чворовима. Промене су се огледале у смањењу њихове апсолутне и релативне масе, као и смањењу броја периферних лимфоцита, а примена Т4 је код ових јединки довела до обнављања лимфатичног система и имунске функције (Fabris, 1973). Према Bendyug и сар. (2003), тиреоидектомија код пацова доводи до смањења апсолутне величине и



целуларности тимуса и слезине, у периоду 1-6 месеци након тиреоидектомије, а смањена целуларност слезине је праћена и супресијом имунског одговора. У овом огледу, укупан број леукоцита, апсолутни и релативни садржај лимфоцита и Т-лимфоцита у периферној циркулацији нису се разликовали од контроле. Добијене резултате аутори објашњавају директним утицајем промене нивоа тиреоидних хормона на имунске ћелије или индиректним деловањем хипотиреозе преко смањене ендокрине функције тимуса и нивоа тимопоетина.

Хипотиреоидизам индукован четворонедељном применом антитиреоидних лекова, карбимазола или метимазола, код пацова доводи до прогресивне атрофије тимуса коју карактерише повећана апоптоза тимоцита и фагоцитоза тимоцита од стране макрофага, са последичним смањењем броја тимоцита (Abou-Rabia и Kendall, 1994). Erf (1983) наводи да матернални хипотиреоидизам доводи до повећања односа  $CD4^+/CD8^+$  лимфоцита у тимусу потомства и смањења  $CD4^+/CD8^+$  односа у слезини. Rooney и сар. (2003) описују смањење масе и целуларности тимуса и слезине услед индиректног излагања новорођених пацова пропилтиоурацилу, које није довело до трајних измена у овим лимфатичним органима. У овом огледу је примена PTU код женки током лактације, након 22 дана код новорођених јединки довела до смањења броја Т лимфоцита у тимусу, али са повећаном проценуалном заступљеношћу  $CD4^+$ , а касније и  $CD8^+$  ћелија, без значајне разлике у њиховом међусобном односу. Процентуална заступљеност ћелија Т популације у слезини је била повећана након 22 дана примене PTU, а у истом термину је забележен и повећан однос  $CD4^+/CD8^+$ . Излагање пропилтиоурацилу током интраутериног развоја и лактације у испитивању Nakamura и сар. (2007), довело је до повећања процентуалне заступљености Т ћелија у слезини и повећања заступљености  $CD4^+$ , али и  $CD8^+$  популације. Ови аутори су забележили и промену у релативној заступљености  $CD4^+CD25^+$   $T_{reg}$  ћелија у слезини.

Watanabe и сар. (1995) нису утврдили никакве промене у заступљености различитих субпопулација лимфоцита у тимусу код женки мишева након 8 и 32 недеље третмана пропилтиоурацилом у концентрацији од 0,1%. Иако је примена PTU током 8 недеља довела је до смањења нивоа  $fT4$  у серуму, није

узроковала измене у апсолутној и процентуалној заступљености популације Т ћелија у слезини. Након 32 недеље PTU третмана забележено је смањење процентуалног учешћа укупне популације Т ћелија слезине у односу на еутиреоидну контролу, без значајности разлика у њиховом апсолутном броју. Klecha и сар. (2006) такође нису забележили утицај измењеног тиреоидног статуса на однос између поједначних субпопулација лимфоцита у периферним имунским ткивима. Након примене Т4 током 30 дана, односно PTU у дози од 0,5 mg/mL воде за пиће током 18 дана, није забележена разлика између хипотиреоидних, еутиреоидних и хипертиреоидних јединки у заступљености различитих субпопулација Т лимфоцита (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> ћелија), нити у односу CD4/CD8 популације лимфоцита у слезини и лимфним чворовима, утврђивано методом проточне цитометрије. Насупрот овим резултатима, Racini и сар. (1983) су установили смањен проценат супресорских Т ћелија и последично повећање односа помоћничких и супресорских Т ћелија у слезинама хипотиреоидних пацова. Истовремена примена Т3 је спречила овај утицај пропилтиоурацила.

Тиреоидни статус утиче на активацију и одговор Т лимфоцита на стимулацију митогенима, са смањењем одговора код хипотиреозе и његовим обнављањем са применом тиреоидних хормона. У испитивању Chatterjee и Chandel (1983), тиреоидектомија је супримирала бластогени одговор лимфоцита пореклом из различитих лимфатичних ткива и периферне крви на митогене РНА (фитохемаглутинин) и PWM, а примена Т3 током 15 дана је овај одговор обновила. Уклањање тиреоидне жлезде код новорођених и јувенилних одраслих пацова смањило је одговор спленоцита на РНА, са обнављањем одговора са применом Т4 (Fabris, 1973). Klecha и сар. (2006) су испитивали утицај статуса тиреоидне осовине на активацију Т и Б лимфоцита *in vivo* и установили јасну везу између нивоа Т3 и пролиферације лимфоцита. Хипотиреоза је узроковала смањен пролиферативни одговор ћелија на ConA (конкавалин А; митоген Т-ћелија) и LPS (липополисахарид; митоген Б-ћелија) у односу на еутиреоидну контролу. Примена Т3, праћена порастом нивоа овог хормона и падом нивоа TSH без промене нивоа Т4, код ових животиња довела је до обнављања одговора на ниво који је био близу вредности контролне

групе. У истом огледу, Klecha и сарадници су код Т и Б лимфоцита забележили разлику у укупном садржају протеин-киназе РКС (енг. *Protein Kinase C*), са ниским вредностима забележеним код хипотиреозе. Овај ензим припада једном од главних путева који покрећу пролиферацију лимфоцита, а аутори закључују да је његова експресија вероватно делом регулисана и тиреоидним хормонима.

### 3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Узимајући у обзир доступна научна сазнања о утицају селена и тиреоидних хормона на имунски статус и функције имунског система, наше истраживање је имало следеће циљеве и задатке:

1. Да се утврди статус селена одређивањем концентрације селена у пуној крви и одређивањем активности глутатион пероксидаза 1 (из крви) и 3 (из крвне плазме)
2. Да се утврди статус тиреоидних хормона одређивањем концентрација Т3, Т4 и TSH
3. Да се утврди утицај дефицита селена и утицај инхибитора дејодиназа код селенадекватних и селендефицитних пацова на функционалне параметре урођеног имунитета, одређивањем продукције пероксида код перитонеалних макрофага.
4. Да се утврди утицај дефицита селена и утицај инхибитора дејодиназа код селенадекватних и селендефицитних пацова на функционалне параметре урођеног имунитета, одређивањем капацитета за адхеренцу перитонеалних макрофага.
5. Да се утврди утицај дефицита селена и утицај инхибитора дејодиназа код селенадекватних и селендефицитних пацова на целуларност лимфатичних органа, одређивањем целуларности (укупног броја леукоцита) слезине.
6. Да се утврди релативна заступљеност и апсолутни број популација Т и Б лимфоцита и НК ћелија у слезинама селендефицитних пацова, и селенадекватних и селендефицитних пацова уз примену инхибитора дејодиназа.
7. Да се утврди утицај дефицита селена и утицај инхибитора дејодиназа код селенадекватних и селендефицитних пацова на титар природних антитела.
8. Да се утврди утицај дефицита селена и утицај инхибитора дејодиназа код селенадекватних и селендефицитних пацова на функционалне параметре стеченог имунитета, одређивањем примарног (IgM) и секундарног (IgG) имунског одговора на антигене овчијих еритроцита.
9. Да се изврши статистичко уопштавање добијених резултата.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 4.1. Материјал

#### 4.1.1. Експерименталне животиње

У циљу испитивања утицаја статуса селена и хормона тиреоидне осовине на параметре имунског одговора, спроведен је оглед на пацовима према дизајну експеримента који је дефинисан протоколом одобреним од стране Етичког комитета за рад са животињама, Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду (дозвола од 22. октобра 2008.). Експерименти су рађени на *Wistar* пацовима мушког пола, пореклом из лабораторије *Charles River* у Мађарској (*Crl:WI outbred*), старости 21 дан на почетку експеримента. Просечна телесна маса пацова је на почетку експеримента била  $48,6 \pm 7,8$  g и на основу ње су формиране уједначене експерименталне групе. Експеримент је изведен са укупно 128 животиња. Животиње су гајене и експерименти су изведени у лабораторијама Агенције за лекове и медицинска средства Србије и Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Пацови су били смештени у виваријуму, у стандардним кавезима, са по 4 јединке у кавезу. Циклус осветљења је био 12-12h, просечна температура  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , а храну и воду су добијали *ad libitum*. Животиње су држане у условима који их изолују од потенцијалне инфекције.

#### 4.1.2. Дизајн експеримента

Пацови ( $n=128$ ) су били подељени у укупно осам експерименталних група од по 16 јединки (табела 4.1.2.1). Цео оглед је трајао седам недеља, с тим што је једна половина животиња из сваке експерименталне групе у огледу била три недеље, а друга половина седам недеља. Током огледа је половини пацова који су формирали селенадекватне групе давана храна са адекватним садржајем селена ( $0,334$  mg/kg). Другој половини пацова који су формирали селендефицитне групе у циљу изазивања дефицита селена давана је храна са

веома ниским садржајем селена (0,031 mg/kg). Животињама су даване готове смеше хране за пацове произвођача *Altromin* из Немачке. Храна са адекватним садржајем селена (контролна храна С-1000) је давана групама I, II, III и IV, док су групе V, VI, VII и VIII храњене селендефицирном храном (С-1045). Детаљни подаци о саставу хране приказани су у табели 4.1.2.2.

**Табела 4.1.2.1.** Третмани инхибиторима дејодиназа у селенадекватним и селендефицирним групама пацова: огледне групе

Селенадекватне групе (Se+) (n=64)				Селендефицирне групе (Se-) (n=64)			
I (n=16)	II (n=16)	III (n=16)	IV (n=16)	V (n=16)	VI (n=16)	VII (n=16)	VIII (n=16)
PTU-	PTU-	PTU+	PTU+	PTU-	PTU-	PTU+	PTU+
IA-	IA+	IA-	IA+	IA-	IA+	IA-	IA+

(Se) селен; (PTU) пропилтиоурацил; (IA) јопаноична киселина; (-) без третмана инхибиторима дејодиназа; (+) третман инхибиторима дејодиназа.

У циљу инхибиције ензима дејодиназа животињама су апликовани инхибитори дејодиназа, пропилтиоурацил и јопаноична киселина. Пропилтиоурацил (6-пропил-2-тиоурацил; 6-PTU) је набављен од компаније Sigma. Пацовима из група III, IV, VII и VIII пропилтиоурацил је апликован кроз воду за пиће током читавог експеримента, почевши од првог дана експеримента, у концентрацији 0,0015% (150 mg/L). Да би неутралисали горак укус пропилтиоурацила, због кога пацови одбијају да узимају воду, у раствор је додаван вештачки заслађивач аспартам. У експериментима је коришћена јопаноична киселина у облику прашка, чистоће 98% (ABCR GmbH&Co.KG, Немачка). Пре парентералне апликације јопаноична киселина је растворена у 0,05M NaOH, а рН коригован до 7,8 неутрализацијом са HCl. Добијени раствор јопаноичне киселине је апликован интраперитонеално (i.p.) животињама из II, IV, VI и VIII групе, сваких седам дана, почевши од осмог дана експеримента, у дози од 0,5 mL раствора тј. 6 mg јопаноичне киселине на 100 g телесне масе. Контролна група целог огледа је била група I - селенадекватна група нетретирани инхибиторима дејодиназа (Se+ PTU-IA-).

**Табела 4.1.2.2.** Хемијски састав хране за пацове (Altromin)

	<b>Контролна, селеандекватна храна (C 1000)</b>	<b>Селеандефицитна храна (C 1045)</b>
<b>Општи хемијски састав</b>		
Метаболичка енергија (kcal/kg)	3518,1	3502,9
Сирови протеини (%)	17,61	17,33
Сирова маст (%)	5,08	6,02
Сирова влакна (%)	4,04	3,53
<b>Сиров пепео (%)</b>	<b>5,49</b>	<b>5,52</b>
Калцијум (g/kg)	9,53	9,25
Фосфор (g/kg)	14,74	14,70
Лизин (g/kg)	17,4	11,5
Метионин (g/kg)	10,68	5,75
Цистин (g/kg)	3,2	/
<b>Витамини и микроелементи</b>		
Витамин А (IU/kg)	15000	16500
Витамин D <sub>3</sub> (IU/kg)	500	550
Витамин Е (mg/kg)	163,9	165,0
Витамин К <sub>3</sub> (mg/kg)	10,00	11,00
Витамин В <sub>1</sub> (mg/kg)	20,04	22,00
Витамин В <sub>2</sub> (mg/kg)	20,32	22,00
Витамин В <sub>6</sub> (mg/kg)	15,03	16,50
Витамин В <sub>12</sub> (mg/kg)	0,040	0,033
Никотинска киселина (mg/kg)	50,17	55,00
Пантотенска киселина (mg/kg)	50,11	55,00
Фолна киселина (mg/kg)	10,01	11,00
Холин хлорид (mg/kg)	1011,5	1100,0
Биотин (mg/kg)	0,2	0,4
Витамин С (mg/kg)	20,00	22,00
Магнезијум (mg/kg)	739,8	769,27
Натријум (mg/kg)	2500,16	2466,2
Калијум (mg/kg)	7171,34	9202,9
Бакар (mg/kg)	5,641	8,426
Гвожђе (mg/kg)	178,58	174,31
Цинк (mg/kg)	29,30	46,73
Манган (mg/kg)	100,89	98,99
Јод (mg/kg)	0,450	0,410
Кобалт (mg/kg)	0,147	0,147
<b>Селен (mg/kg)</b>	<b>0,334</b>	<b>0,031</b>

Након две недеље од почетка експеримента, половини јединки из сваке од 8 експерименталних група (n=8) је изазвана стерилна инфламација једнократном интраперитонеалном апликацијом 12 mL тиогликолатног медијума. Тиогликолатни медијум је добијен растварањем 2,4 g тиогликолата у 100 mL воде; након 15 минута раствор је стављен да прокључа, а затим профильтрован. Третиране јединке су 7 дана након апликације тиогликолата, односно након три недеље експеримента, увођене у етарску анестезију, након чега је од сваке кардијалном пункцијом узето 3-5 mL крви у хепаринисане епрувете (15 IU хепарина/mL крви). Из дела ове крви издвојена је плазма центрифугирањем у трајању од 20 min, брзином од 1000 x g. Пуна крв је коришћена и за одређивање статуса селена, а плазма је послужила за дефинисање статуса хормона тиреоидне осовине испитивањем концентрације хормона T3, T4 и TSH. У плазми је одређиван и титар IgM и IgG антитела на овчије еритроците. Од истих животиња су, након узимања крви, поступком перитонеалне лаваже изоловани макрофаги којима је испитивана способност адхеренце и продукције пероксида.

Друга половина пацова из сваке експерименталне групе је двократно интраперитонеално имунизована са 0,5 mL 10% суспензије овчијих еритроцита (енглески: *sheep red blood cells*, *SRBC*) у стерилном физиолошком раствору. Прва имунизација је спроведена 32. дана огледа, а друга након 15 дана (47. дан огледа). У циљу процене примарног имунског одговора, пет дана након прве имунизације животињама је из репне вене извађена крв, из које је изолована плазма која је до анализа чувана на -20°C. По истеку седам недеља експеримента, 3 дана након друге имунизације, пацови су увођени у етарску анестезију, након чега им је кардијалном пункцијом узимана крв и из дела крви издвајана плазма. Део плазме је замрзнут на -20°C и у тим узорцима је одређиван титар антитела на овчије еритроците. У крви ових животиња одређиван је и статус селена и хормона тиреоидне осовине, испитивањем истих параметара као и након 3 недеље огледа.

Од жртвованих пацова изоловане су слезине. Слезине су анализирани на укупну целуларност, као и процентуалну заступљеност Т и Б лимфоцита и НК ћелија методом проточне цитометрије, и израчунаван је њихов апсолутни број.



## 4.2. Методе

### 4.2.1. Одређивање концентрације селена

Концентрација селена у пуној крви одређивана је хидридном техником на атомском апсорпционом спектрофотометру (Милановић, докторска дисертација, 2012). Селен је из органске материје преведен у неорганско стање микроталасном дигестијом у микроталасној пећи Milestone, модел Touch Control. Сваки узорак је измерен и преливен са 8 mL концентроване азотне киселине и 2 mL 30% водоник пероксида. Смеса је у тefлонској кивети излагана температури од 1800 °C током 15 минута, по дефинисаном температурном програму. Након деструкције органске материје, садржај кивете је пренесен у нормални суд од 25 mL и допуњен са 5M HCl. У овако припремљеном узорку селен је био у облику Se (VI), а загревањем са 5M HCl је редукован у Se (IV) који са NaBH<sub>4</sub> ствара SeH<sub>4</sub>. Концентрација насталог SeH<sub>4</sub> се одређује атомском апсорпцијом. Анализа је изведена на уређају Thermo Electron Solaar AA, Series 4, са VP70 хидридним модулом и електричним загревањем кварцне кивете помоћу EC 90 пећи. Узорци су у хидридни модул уношени помоћу AC 2000 аутосамплера. Носећи гас за SeH<sub>4</sub> био је аргон чистоће 4,8 са протоком од 250 mL/min. Стабилизационо време хидридног модула током грађења хидрида било је 50 секунди по узорку, мерење апсорпције је вршено у три репликата по 4 секунде, а чишћење система и припрема за следећи узорак је трајала 60 секунди. Кварцна кивета је загревана на 9000 °C. Апсорпција је мерена на 196 nm. Мерење апсорпције је изведено уз позадинску корекцију са деутеријумовом лампом. Контрола квалитета је изведена мерењем 3 стандардна раствора селена (5, 10 и 20 ug/L), израдом калибрационе праве и једначине праве. Корелациони коефицијент стандардне праве је био 0,998. Стандардни раствори су инјектовани на почетку и на крају сваког аналитичког лота. Контрола квалитета је такође извођена анализирањем сертификованог референтног материјала BCR 185 (IRMM, Белгија). Добијене вредности за репликате су биле у оквирима сертификоване вредности.

#### 4.2.2. Одређивање активности глутатион пероксидаза

Статус селена је процењиван и на основу активности глутатион пероксидазе у пуној крви и у крвној плазми, које су одређиване модификованом спектрофотометријском методом по Günzler и сар. (1974), на спектрофотометру Сесил 2000, са воденим купатилом и термостатом са сталном температуром при мерењу од 37 °C (Милановић, докторска дисертација, 2012).

Принцип мерења је базиран на спектрофотометријском регистровању потрошње NADPH у куплованом ензимском систему. У овом низу реакција GPx присутна у узорку пуне крви врши редукцију терцијарног бутил хидропероксида (TBH). Глутатион се, као непосредни давалац водоника, оксидује у GS-SG. У другој фази оксидовани глутатион (GS-SG) се регенерише у редуковани облик помоћу NADPH. Стабилност концентрације редукованог глутатиона (GSH) одржава се тако што се систему додаје ензим глутатион редуктаза (GR) (E.C.1.6.4.2.). Два минута пошто реакција почне додавањем TBH, брзина потрошње NADPH се региструје у интервалима по 60 секунди током 3 минута на таласној дужини од 366 nm. Разлика у брзини потрошње NADPH између узорка и следеће пробе представља активност GPx. Слепа проба садржи све реагенсе у истим количинама, али без присуства узорка.

Раствори GR, GSH и NADPH (Sigma-Aldrich) увек су свеже припремани уз коришћење редестиловане воде као растварача за GR и GSH, односно 0,1% NaHCO<sub>3</sub> за NADPH.

У епрувету је сипано 500 µL калијум фосфатног пуфера који обезбеђује оптимални рН средине (рН=7) за деловање GPx. Затим је додато 200 µL глутатиона (GSH), 50 µL глутатион редуктазе (GR), 20 µL пуне крви хемолизоване Драпкиновим реагенсом (разблажење 11 пута) и 480 µL редестиловане воде. Раствор је преинкубиран у воденом купатилу 10 минута на 37 °C након чега је додато 200 µL редукованог коензима (NADPH) и 550 µL TBH. Након 2 минута од почетка реакције вршено је мерење потрошње NADPH у интервалима од 30 секунди.

Активност плазматске глутатион пероксидазе (GPx3) одређивана је истим поступком при чему је количина узорка плазме била 5 µL. Ниска

концентрација ТВН ( $< 2,32 \text{ mmol}$ ) која је коришћена у овој методи омогућава да се мери само активност селензависне глутатион пероксидазе (Burk и сар., 1978).

Активност цитосолне глутатион пероксидазе еритроцита (GPx1) израчунавана је као разлика између активности глутатион пероксидазе пуне крви и глутатион пероксидазе крвне плазме.

#### **4.2.3. Одређивање концентрације хормона тиреоидне осовине: T3, T4, TSH**

Процена тиреоидног статуса испитиваних јединки вршена је на основу вредности концентрација тријодтиронина (T3), тироксина (T4) и тиреостимулирајућег хормона (TSH) у плазми. За одређивање концентрација укупног T3 и T4 коришћени су комерцијални RIA китови (ИНЕП, Земун), а за одређивање концентрација тиреотропног хормона (TSH) пацова коришћен је комерцијални RIA кит (Rat TSH RIA, MP Biomedicals, Белгија) (Милановић, докторска дисертација, 2012).

Тест за одређивање концентрација укупног тријодтиронина (T3) и тироксина се заснива на конкуритивном везивању серумског T3 и T4 и радиоактивно обележених T3 и T4 за епитопе на специфичним анти-T3 односно анти-T4 антителима, при чему настају обележени и необележени имунокомплекси. Уколико има више серумског T3 и T4, формира се мање обележеног комплекса. После завршене реакције сви настали комплекси су таложени полиетиленгликолом (PEG) док су слободни обележени и необележени T3 и T4 као и слободна антитела заостала у течној фази. Радиоактивност талога мерила се гамасцинтилационим бројачем CompuGamma LKB, Белгија. Истовремено са узорцима серума су третирани и стандарди који садрже различите, али тачно дефинисане концентрације T3 и T4. На основу прочитаних вредности стандарда је формирана стандардна крива помоћу које су одређиване концентрације T3 и T4 у узорцима.

За одређивање концентрација тиреотропног хормона (TSH) у плазми огледних животиња коришћен је комерцијални RIA кит, а тест се заснива на конкуритивном везивању TSH и радиоактивно обележеног  $^{125}\text{I}$ -TSH за епитопе

високоспецифичних поликлонских анти-TSH антитела кунића. Због константних концентрација обележеног TSH и анти-TSH антитела, количина награђених имунокомплекса зависи од концентрације TSH у узорку плазме. Након инкубације су се слободни и везани TSH одвајали додавањем секундарног антитела (мишје моноклонско антитело за IgG кунића). Радиоактивни имунокомплекси су преципитовани центрифугирањем, након чега је читавана радиоактивност гамасцинтилационим бројачем CompuGamma LKB, Белгија. Истовремено са узорцима серума су испитивани и стандарди који садрже различите, али тачно дефинисане концентрације TSH. На основу читаних вредности стандарда је формирана стандардна крива помоћу које су одређиване концентрације TSH у узорцима.

#### 4.2.4. Испитивање функције перитонеалних макрофага

Утицај примењеног третмана, тј. дефицита селена и инхибиције активности дејодиназа и следственог хипотиреоидизма на параметре неспецифичног имунитета пацова, испитиван је на основу њиховог модулативног дејства на функције перитонеалних макрофага. Функционални статус перитонеалних макрофага процењиван је *in vitro* тестовима: 1) способност адхеренце и 2) продукција пероксида.

За добијање индукованих перитонеалних макрофага, пацовима из сваке експерименталне групе је интраперитонеално апликовано по 12 mL тиогликолатног медијума (24 mg тиогликолата /mL воде). После седам дана пацови су жртвовани, а трбушна дупља је испирана убризгавањем 15 mL стерилног изотоничног 10 mM фосфатног пуфера, pH 7,2-7,4 (енглески: *phosphate buffered saline; PBS*) (перитонеална лаважа). Са дна трбушне дупље је стакленим шприцем усисавана течност и преношена у епрувете. Ћелије су исталожене центрифугирањем, 10 min брзином од 1200 обртаја/min, ресуспендоване у 3 mL *PBS*, испране центрифугирањем и финално ресуспендоване у 2 mL *PBS*. Ћелије су бојене Turk-овим раствором и одређена им је концентрација бројањем у хемоцитометру. Додавањем *PBS* концентрација ћелија у суспензији је подешена на  $2,5 \times 10^6$ /mL.

#### 4.2.4.1. Тест адхеренце макрофага

У бунариће микротитарске плоче са 96 места са равним дном је прво додато по 50  $\mu\text{L}$  PBS, а затим по 50  $\mu\text{L}$  ћелијске суспензије добијене на претходно описан начин. Број ћелија у бунарићу је био  $1,25 \times 10^5$ . Ћелије су остављене да адхерирају 10, 30 или 60 min у инкубатору за ћелијске културе на 37°C. Након наведених периода инкубације, плоче су 3 пута испиране додавањем 200  $\mu\text{L}$  PBS загрејаног на 37°C. Адхерентне ћелије су прво фиксиране метанолом (100  $\mu\text{L}$ /бунарићу) у трајању од 6 min, а затим 10 min бојене профилтрованим 0,1% воденим раствором метиленплавог (100  $\mu\text{L}$  по бунарићу). Вишак боје је уклоњен испирањем водом а затим су плоче осушене преко ноћи на 37°C. Сутрадан је додата 0,1M HCl (100  $\mu\text{L}$ /бунарићу) након чега су плоче инкубиране 4 сата у влажном купатилу, на 37°C, до потпуног растварања преципитиране боје. Интензитет растворене боје је одређиван на читачу микротитарских плоча (GDV, Microplate Reader DV 990 BV 4/6) мерењем апсорбанције на 620 nm.

#### 4.2.4.2. Синтеза водоник пероксида у макрофагима

Способност продукције пероксида код индукованих перитонеалних макрофага испитивана је у *in vitro* условима, након стимулације форбол мирилат ацетатом (енглески: *phorbol 12-myristate 13-acetate*; PMA). Метода се заснива на реакцији у којој пероксидаза катализује превођење фенолцрвеног под дејством  $\text{H}_2\text{O}_2$  у обојени производ реакције који има повећану апсорбанцу на 600-610 nm (Pick и Mizel, 1981., Митић и сар. 2010).

Тест је изведен тако што је по 100  $\mu\text{L}$  суспензије са  $2,5 \times 10^5$  перитонеалних ћелија наносено у бунариће микротитарских плоча са равним дном. Тест је рађен у у дупликату. Ћелије су остављене да адхерирају 2 сата на 37°C. Након тог времена неадхерентне ћелије су уклањане испирањем плоча у два циклуса топлим раствором медијума за културе ћелија (MEM, Sigma). Стварање пероксида код адхерентних макрофага је стимулирано додавањем 100  $\mu\text{L}$  25 nM PMA у раствору фенол црвеног (140 mM NaCl; 10 mM фосфатни

пуфер, pH 7,0; 5,5 mM декстроза; 0,56 mM фенол црвено и 19 U/mL пероксидазе рена). Да би се елиминисало неспецифично бојење у контролне бунариће су такође додате ћелије, али је одмах након њиховог додавања у ове бунариће додато 10  $\mu$ L NaOH за спречавање продукције H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Након додавања РМА, плоче су инкубиране 1 сат на температури 37°C, а реакција је заустављена додавањем 10  $\mu$ L NaOH. Апсорбанција формираног обојеног једињења на 620 nm је измерена на читачу микротитарских плоча (GDV, Microplate Reader DV 990 BV 4/6). Стандардна крива за одређивање продукције H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> конструисана је на основу познатих концентрација H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у опсегу 1-40  $\mu$ M (Митић и сар., 2010).

#### **4.2.5. Одређивање титра IgM и IgG антитела на овчије еритроците**

За квантитативно одређивање титра антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми пацова коришћени су комерцијални ELISA китови и то *Rat Anti-SRBC IgM ELISA Kit* (Life Diagnostics, Inc. PA, USA); каталошки број 4200-2) и *Rat Anti-SRBC IgG ELISA Kit* (Life Diagnostics, Inc. PA, USA; каталошки број 4210-2). Као антиген(и) којим су обложене микротитарске плоче су коришћене мембране овчијих еритроцита. Тест је изведен по упутству произвођача, тако што је у бунариће са антигенима додаван испитивани серум пацова разблажен 1:50 у приложеном пуферу, и стандарди који су имали познат титар IgM и IgG антитела на овчије еритроците. Реконституцијом приложених лиофилизованих референтних серума у дестилованој води, и затим додавањем растварача, направљени су радни стандарди који је садржали 100 U/mL специфичних IgM односно IgG. Њиховим двоструким серијским разблаживањем припремљени су стандарди концентрације од 50 до 3 U/mL специфичних IgM и од 50 до 6 U/mL специфичних IgG. Добијени стандарди и разблажени узорци су нанети у бунариће плоче. Након 45 min инкубације на собној температури плоче су испране, а затим су у одговарајуће бунариће додата секундарна антитела реактивна са IgM односно IgG пацова, која су коњугована са пероксидазом рена. Након инкубације и испирања плоча формирани имунокомплекси су

визуелизовани додавањем супстрата пероксидазе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Реакција је прекинута након 20 min додавањем 0.16 M сумпорне киселине. Апсорбанца обојеног производа на 450 nm је мерена на читачу микротитарских плоча. Количина (титар) специфичних антитела у испитиваним узорцима плазме је пропорционална апсорбанци узорка и одређена је на основу стандардне криве зависности апсорбанце од титра специфичних IgM и IgG антитела реактивних на овчије еритроците у референтним серумима.

#### **4.2.6. Одређивање релативне заступљености (%) и апсолутног броја Б, Т, НК ћелија у слезини пацова методом проточне цитометрије**

##### **4.2.6.1. Припрема ћелија слезине за проточну цитометрију и одређивање укупног броја леукоцита (целуларности) слезине**

Изоловане слезине су постављане у петри шоље на чијем дну се налазила мрежица од нерђајућег челика. Мрежица је била покривена слојем PBS-а. Ћелије су изоловане притиском клипа пластичног шприца на ткиво слезине преко мрежице. Суспензија ћелија слезина је разблажена PBS-ом, а затим су остаци фиброзне строме уклоњени филтровањем суспензије кроз газу. Ћелије су исталожене и испране двоструким центрифугирањем и ресуспендоване у PBS. Еритроцити су лизирани изотоничним амонијум-хлоридом, а нелизиране ћелије су испране двоструким центрифугирањем и ресуспендоване у PBS 1mM EDTA. Запремина ове ћелијске суспензије је измерена, ћелије су бојене Турск-овим реагенсом, а концентрација им је одређена бројањем у хемоцитометру. Укупна целуларност је израчуната по формули:

$$\text{Број ћелија [x10}^6\text{]} = \frac{\text{Концентрација ћелија [x10}^6\text{/mL]}}{\text{x}} \times \frac{\text{запремина ћелијске суспензије [mL]}}{\text{[mL]}}$$

#### 4.2.6.2. Обележавање ћелија слезине моноклонским антителима

Аликвоти са  $2-5 \times 10^5$  леукоцита су ресуспендовани у PBS-у са 0,5% говеђим серумским албумином (енглески: *bovine serum albumine*, BSA) – PBS/BSA. Након испирања, на исталожене ћелије су додавана антитела реактивна са површинским молекулима Т и Б лимфоцита и NK ћелија (табела 4.2.6.2.1.).

**Табела 4.2.6.2.1.** Моноклонска антитела коришћена за детекцију антигена експримираних на ћелијама слезине пацова

Антиген	Клон	Изотип	Врста	Коњугат	Произвођач	Кат. број
<b>Rat CD3</b>	1F4	IgM	миш	FITC	Invitrogen	MR5301
<b>Rat CD45RA</b>	OX-33	IgG1	миш	PE	Invitrogen	MR6404
<b>Rat NKR-P1A</b>	10/78	IgG1	миш	PE	Invitrogen	MR6804

Сва антитела су била разблажена PBS/BSA а инкубација је трајала 30 min, на 4°C у мраку. Ниво неспецифичног везивања је одређен инкубацијом са контролним антителима одговарајућег изотипа (табела 4.2.6.2.2.). Након инкубације, вишак антитела је уклоњен двоструким испирањем ћелија у PBS након чега су ћелије фиксиране у 2% параформалдехиду раствореном у PBS.

**Табела 4.2.6.2.2.** Антитела коришћена као изотипске контроле

	Коњугат	Произвођач	Кат. број
<b>Мишја IgM антитела</b>	FITC	Invitrogen	MGM01
<b>Мишја IgG1 антитела</b>	R-PE	Invitrogen	MG104

#### 4.2.6.3. Анализа ћелија проточном цитометријом

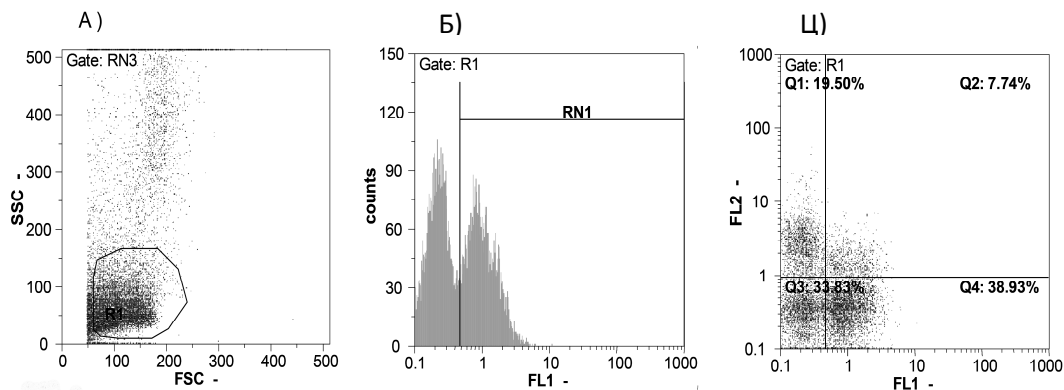
Ћелије обележене моноклонским антителима реактивним са површинским антигенима Т, Б и NK ћелија анализирани су проточним цитометром CyFlow SL (Partec, Münster, Немачка). Флуоресценца FITC је детектована на 480 nm, а флуоресценца PE на 580 nm.



Расподела ћелија слезине по величини и унутрашњој гранулираности приказана је двопараметарским *forward scatter/side scatter (FLS/SS)* дијаграмом (слика 4.2.6.3.А), на основу кога су софтверски издвојени лимфоцити (популација ћелија мале величине и унутрашње гранулираности) и на којима је даље испитивана експресија површинских маркера. Резултати анализе експресије појединачних маркера су представљени као једнопараметарски дијаграм зависности броја ћелија од интензитета флуоресценце (слика 4.2.6.3.Б) и изражени као проценат (%) позитивних ћелија. Ниво неспецифичне флуоресценце је дефинисан на основу интензитета флуоресценце контролних узорака и није износио више од 2%. Резултати истовременог обележавања ћелија са два различита антитела коњугована различитим флуорохромима су приказани двопараметарским хистограмом (слика 4.2.6.3.Ц) и изражени као проценти ћелија 1) које експримирају само један од два анализирана молекула, 2) које експримирају оба молекула и 3) које не експримирају ни један од анализираних молекула.

Апсолутан број ћелија које експримирају неки маркер (тј. број позитивних ћелија) израчунат је по формули:

$$\text{Број позитивних ћелија [x10}^6\text{]} = \{(\text{Укупан број леукоцита слезине [x10}^6\text{)])} \times (\% \text{ позитивних ћелија})\} / 100$$



**Слика 4.2.6.3.** Графички прикази резултата проточне цитометрије слезине пацова  
 А) Дијаграм расподеле ћелија по величини и унутрашњој гранулираности – *FCS/SSC* дијаграм. Означена је популација малих ћелија ниске гранулираности. Б) Дијаграм расподеле броја ћелија зависно од нивоа флуоресценце. Вертикална линија означава граничну вредност нивоа неспецифичне флуоресценце. Ц) Приказ резултата двоструког обележавања ћелија антителима коњугованим црвеним (FL1) и зеленим (FL2) флуорохромима двопараметарским дијаграмом. Вертикална линија означава граничну вредност нивоа неспецифичне црвене флуоресценце. Хоризонтална линија означава граничну вредност нивоа неспецифичне зелене флуоресценце.

### 4.3. Статистичка обрада резултата

Резултати испитивања обрађени су стандардним статистичким методама коришћењем *Microsoft Office Excel* програмског пакета. Израчунате су средња вредност, стандардна девијација, стандардна грешка, медијана, минимална и максимална вредност и коефицијент варијације у огледним групама. Резултати су груписани у статистичке серије и приказани у виду табела и хистограма. За оцену статистичке значајности разлика средњих вредности/медијана анализираних група примењен је Студентов Т-тест односно Mann-Whitney U-тест, где је вредност вероватноће (p) мања од 0,05 означена као статистички значајна. За утврђивање корелационе зависности параметара коришћена је корелациона анализа, а процена значајности коефицијента корелације је вршена на основу Pearson-ове таблице.

## **5. РЕЗУЛТАТИ**

### **5.1. Статус селена и статус хормона тиреоидне осовине селенадекватних и селендефицитних пацова**

Статус селена је процењен на основу резултата мерења концентрације селена у крви и активности цитосолне глутатион пероксидазе еритроцита (GPx1) и активности глутатион пероксидазе у крвној плазми (GPx3). Статус хормона тиреоидне осовине је процењен на основу резултата мерења концентрације тироксина (T4), тријодтиронина (T3) и тиреостимулирајућег хормона (TSH) у крвној плазми. Резултати након три и седам недеља третмана су приказани у табелама 5.1.1. и 5.1.2.

**Табела 5.1.1.** Статус селена и статус хормона тиреоидне осовине селенадекватних и селендефицичних пацова након 3 недеље третмана

	Селенадекватне групе (Se <sup>+</sup> )				Селендефицичне групе (Se <sup>-</sup> )			
	I PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	II PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	III PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	IV PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	V PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	VI PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	VII PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	VIII PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Телесна маса (g)</b>	176±19	177±18	160±8	157±14	155±14*	152±12*	113±12*	119±13*
<i>Показатељи статуса селена</i>								
<b>Se (µg/L)</b>	365±98	486 ±106	478±105	270±85	58±8*‡	64±14*‡	67±17*‡	67±5 *‡
<b>Грх1 (µkat/L)</b>	153,3±28,6	175,5±51,7	145,3±70,6	141,1±39,5	73,7±17,7*	48,5±12,7*#	67,0±12,6*#	132,1±35,9‡#
<b>Грх3 (µkat/L)</b>	55,3±17,8	65,7±11,0	91,4±20,4*	67,0±16,6	32,1±14,9*‡	42,1±23,2‡	37,6±14,8‡	38,5±11,8‡
<i>Показатељи тиреоидног статуса</i>								
<b>T4 (nmol/L)</b>	85,9±23,7	93,3±12,5	21,9±12,4*	33,2±7,0*	85,7±11,1	94,5±15,9	18,5±10,9*#	23,0±14,2*#
<b>T3 (nmol/L)</b>	2,2±0,3	2,3±0,2	1,2±0,4*	0,9±0,7*	1,9±0,3	2,2±0,3	1,6±0,4*	1,0±0,6*#
<b>TSH (ng/mL)</b>	4,1±2,7	6,0±2,8*	87,8±10,3*	71,2±9,3*	6,6±3,0*‡	4,5±2,6	85,4±15,6*#	83,0±12,7*#
<b>T3/T4 (%)</b>	2,7±0,6	2,5±0,3	10,2±10,2*	2,5±1,7	2,2±0,2	2,2±0,4	11,4±7,1*#‡	4,2±1,5*#

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SD$

\*- статистички значајна разлика у односу на контролну Se<sup>+</sup> PTU<sup>-</sup> IA<sup>-</sup> групу;

# - статистички значајна разлика међу селендефицичним групама; p < 0,05 у односу на Se<sup>-</sup> PTU<sup>-</sup> IA<sup>-</sup> групу;

‡ - статистички значајна разлика између селендефицичних и селенадекватних група са истим третманом инхибиторима дејодиназа; p < 0,05.

**Табела 5.1.2.** Статус селена и статус хормона тиреоидне осовине селенадекватних и селендефицичних пацова након 7 недеља третмана

	Селенадекватне групе (Se+)				Селендефицичне групе (Se-)			
	I PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	II PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	III PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	IV PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	V PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	VI PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	VII PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	VIII PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
Телесна маса (g)	290±27	289±27	234±28*	221 ±11*	267±17	268±27	120±14*	129±8*
<i>Показатељи статуса селена</i>								
Se (µg/L)	556±165	494±172	427±146	288±165	84±44*‡	69 ±11*‡	94±42*‡	84±28*‡
Gpx1 (µkat/L)	301,5±103,3	354,8±144,1	373,0±78,6	389,8±152,8	88,6±23,9*‡	78,4±14,2*‡	66,3±15,5*‡	125,7±34,5*‡
Gpx3 (µkat/L)	119,4±37,0	90,2±16,4	105,2±21,1	99,2±28,0	23,5±4,3*‡	27,2±3,4*‡	50,6±7,4*#‡	47,6±7,3*#‡
<i>Показатељи тиреоидног статуса</i>								
T4 (nmol/L)	64,7±9,1	84,4±21,6	14,8±6,5*	26,3±10,5*	82,6±8,5	96,8±20,1	nd*#	3,7±2,1*#
T3 (nmol/L)	1,7±0,2	1,7±0,2	1,9±0,2	1,9±0,1	2,1±0,2*‡	2,2±0,3*‡	1,1±0,6*#‡	1,7±0,4
TSH (ng/mL)	5,0±3,3	9,1±0,4*	73,7±13,2*	74,1±8,5*	8,9±0,6*‡	6,6±4,1	99,9±5,4*#‡	91,4±13,0*#‡
T3/T4 (%)	2,7±0,4	2,1±0,5*	15,2±6,5*	6,6±0,9*	2,5±0,1	2,3±0,4	(~ 100)	62,1±31,31*#‡

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SD$ ;

\*- статистички значајна разлика у односу на контролну Se+ PTU- IA- групу;

# - статистички значајна разлика међу селендефицичним групама;  $p < 0,05$  у односу на Se- PTU- IA- групу;

‡ - статистички значајна разлика између селендефицичних и селенадекватних група са истим третманом инхибиторима дејодиназа;  $p < 0,05$ ;

nd – вредности испод границе детекције; (~ 100) – због ниских вредности T4 код јединки из групе VII није било могуће утврдити тачан проценат конверзије T4 у T3, али се судећи по вредностима T3 приближио вредности од 100%.

## 5.2. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на продукцију пероксида у перитонеалним макрофагима

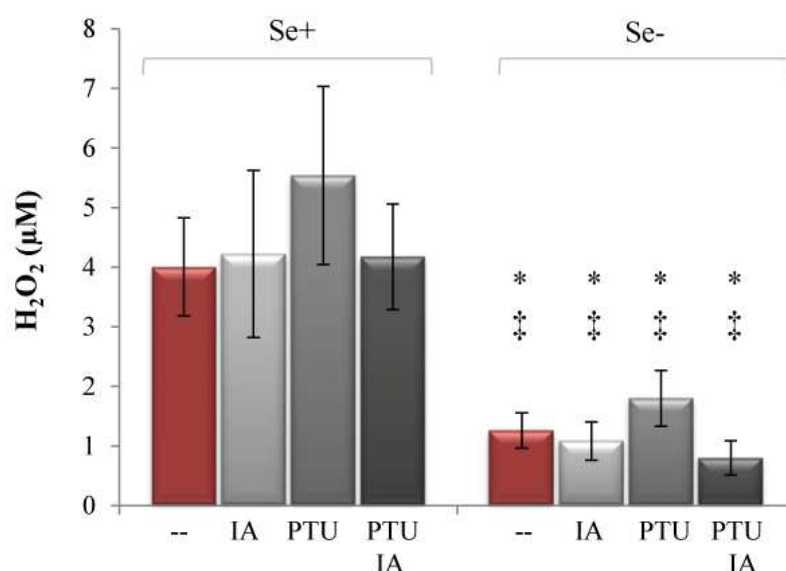
Способност продукције  $H_2O_2$  у перитонеалним макрофагима пацова индукованих применом тиогликолата је испитивана *in vitro* тестом и процењена на основу способности макрофага да синтетишу  $H_2O_2$  у одговору на стимулацију форбол-миристат-ацетатом (енг. *phorbol myristate acetate*, РМА). Испитивање је спроведено након 3 недеље огледа, што је дужина третмана која се показала довољном за постизање значајног смањења концентрације селена у крви у групама храњеним селендефицитном храном, и довољном за постизање инхибиторног ефекта на тиреоидну осовину у групама третираним инхибиторима дејодиназа (табела 5.1.1.). Резултати експеримента приказани су у табели 5.2.1., на слици 5.2.1. и у табели 5.2.2.

**Табела 5.2.1.** Продукција пероксида у перитонеалним макрофагима пацова ( $\mu\text{M}/2,5 \times 10^5$  ћелија) у одговору на стимулацију РМА, након три недеље огледа

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>4,00</b>	2,18	0,82	54,54	1,92-7,75	3,38
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>4,22</b>	3,71	1,40	87,99	0,73-9,96	3,23
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>5,54</b>	4,23	1,50	76,41	1,31-14,58	5,35
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	6	<b>4,17</b>	2,17	0,89	52,01	1,92-7,54	4,10
Se <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	5	<b>1,26</b>	0,65	0,29	52,00	0,70-2,37	1,07
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>1,08</b>	0,85	0,32	77,69	0,23-2,73	1,00
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>1,80</b>	1,23	0,47	68,65	0,23-4,27	1,77
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>0,80</b>	0,82	0,39	102,51	0,15-2,74	0,52

Просечна продукција пероксида забележена у контролној, селенадекватној групи нетретираној инхибиторима дејодиназа (Se+PTU-IA-) износила је  $4,00 \pm 2,18 \mu\text{M}/2,5 \times 10^5$  ћелија. Највиша продукција пероксида је забележена у Se+PTU+IA- групи ( $5,54 \pm 4,23 \mu\text{M}/2,5 \times 10^5$  ћелија), а најнижа у селендефицитној групи третираној са оба инхибитора (Se-PTU+IA+) и износила је  $0,80 \pm 0,82 \mu\text{M}/2,5 \times 10^5$  ћелија.

Третман инхибиторима дејодиназа није значајно модулисао производњу пероксида у перитонеалним макрофагима селенадекватних животиња. У групама селендефицитних животиња продукција  $H_2O_2$  је била статистички значајно мања у односу на контролну селенадекватну групу (инхибиција од 69%, 73%, 55% и 87% за групе Se-PTU-IA-, Se-PTU-IA+, Se-PTU+IA-, Se-PTU+IA+, респективно). Селендефицитне групе су се такође разликовале и од одговарајуће селенадекватне групе са истим третманом инхибиторима дејодиназа (инхибиција од 69%, 74%, 68% и 88%, респективно). Значајност ових разлика је потврђена т-тестом, односно Mann-Whitney U-тестом.



**Слика 5.2.1.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на продукцију пероксида у перитонеалним макрофагима у одговору на стимулацију РМА

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$  продукције водоник пероксида на  $2,5 \times 10^5$  макрофага.

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе; (\*) статистички значајна разлика у односу на контролну, Se+PTU-IA- групу,  $p < 0,05$ ; (#) статистички значајна разлика међу селендефицитним групама,  $p < 0,05$  у односу на Se-PTU-IA- групу; (‡) статистички значајна разлика између селендефицитних и селенадекватних група са истим третманом инхибиторима дејодиназа;  $p < 0,05$ .

**Табела 5.2.2.** Статистичка значајност разлика продукције пероксида у перитонеалним макрофагима, у одговору на стимулацију РМА (*p*-вредност; Студентов т-тест, Mann-Whitney U-тест)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,9	0,4	0,9	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>0,01</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,5	1,0	0,08	<b>0,04</b>	0,1	<b>0,05</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,4	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,01</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,7	0,4	0,3
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,2	0,5
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							0,09

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

У свим групама је установљена велика варијабилност у индивидуалним одговорима, са највишим израчунатим коефицијентом варијације (Cv) од 102% у Se-PTU<sup>+</sup>IA<sup>+</sup> групи. Елиминација екстрема из ове групе је смањила вредност Cv на 46,1%, али није утицала на значајност разлика у односу на контролну групу.

### 5.3. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на адхеренцу перитонеалних макрофага

Ниво адхеренце ћелија за пластику (полистирен) је индиректан показатељ нивоа њихове активације *in vivo* (Oez и сар., 1990). Тест способности адхерирања перитонеалних макрофага за пластику је у овом раду коришћен као додатни параметар за процену утицаја дефицита селена и инхибитора дејодиназа, као модулятора неспецифичног имунског одговора. И ово испитивање је, као и испитивање нивоа продукције пероксида, спроведено након 3 недеље огледа. Примењеним *in vitro* тестом мерен је ниво спонтане адхеренце макрофага након 10, 30 и 60 минута инкубације. Ниво адхеренце је мерен на основу абсорбанце на 620 nm (OD<sub>620</sub>) адхерентних ћелија обојених метиленским плавим (табела 5.3.1.; слика 5.3.1.; табеле 5.3.2.а, 5.3.2.б и 5.3.2.в)



Након 10 минута инкубације вредност  $OD_{620}$  у контролној групи (Se+PTU-IA-) је била  $0,043 \pm 0,004$ . Ниво спонтане адхеренце макрофага контролне групе пацова (Se+PTU-IA-) није био промењен ни након 30, ни након 60 минута инкубације ( $OD_{620}$  после 30 минута је била  $0,047 \pm 0,006$ , а после 60 минута  $0,047 \pm 0,005$ ). Ниво адхеренце макрофага осталих селенадекватних група се није значајно разликовао од контроле ни у једном термину испитивања.

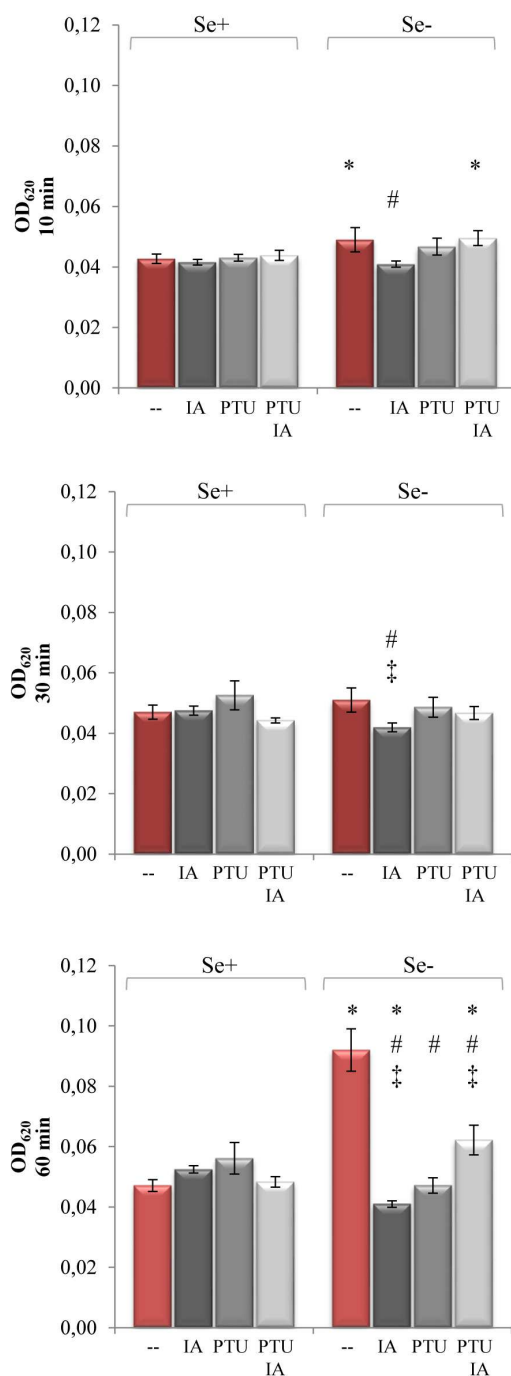
Након 10 минута инкубације селендефицитна група без третмана инхибиторима (Se-PTU-IA-) као и група третирана са оба инхибитора (Se-PTU+IA+) су имале благо, али статистички значајно већи ниво адхеренце, тј. вредности  $OD_{620}$  у односу на контролну селенадекватну групу (Se+PTU-IA-). У истом термину је у селендефицичним групама пацова, у односу на групу нетретирану инхибиторима дејодиназа (Se-PTU-IA-) значајно снижену вредност  $OD_{620}$  (за 17%) имала само група третирана јопаноичном киселином (Se-PTU-IA+).

И након 30 минута инкубације, у селендефицичним групама се само група пацова третираних јопаноичном киселином (Se-PTU-IA+) разликовала од нетретиране (Se-PTU-IA-) групе (18% инхибиције). Ова група пацова је имала за 12% нижу адхеренцу и у односу на свој селенадекватни пар (Se+PTU-IA+).

Након 60 минута инкубације, у селендефицичним групама је вишу адхеренцу у односу на контролну селенадекватну групу (Se+PTU-IA-) имала група нетретирана инхибиторима дејодиназа (Se-PTU-IA-) и група третирана са оба инхибитора (Se-PTU+IA+). Нижу вредност у односу на контролу је имала група третирана јопаноичном киселином (Se-PTU-IA+). Све селендефицидне групе третиране инхибиторима дејодиназа су имале значајно ниже вредности  $OD_{620}$  од Se-PTU-IA- групе. У односу на своје селенадекватне парњаке, значајно различите вредности су имале селендефицитна група нетретирана инхибиторима дејодиназа (скоро двоструко виша вредност  $OD_{620}$ ) и обе групе третиране јопаноичном киселином. При томе је Se-PTU-IA+ имала за приближно 20% нижу вредност  $OD_{620}$  од Se+PTU-IA+ групе, док је Se-PTU+IA+ имала за скоро 30% вишу вредност  $OD_{620}$  од Se+PTU+IA+ групе.

**Табела 5.3.1.** Адхеренца перитонеалних макрофага пацова изражена као абсорбанца ( $OD_{620}$ ) после 10 минута, 30 минута и 60 минута инкубације; након три недеље огледа

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
<b>а) Адхеренца перитонеалних макрофага после 10 минута инкубације (<math>OD_{620}</math>)</b>								
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>0,043</b>	0,004	0,002	9,65	0,039-0,051	0,043
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>0,042</b>	0,002	0,001	5,87	0,038-0,046	0,042
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>0,043</b>	0,003	0,001	7,46	0,040-0,048	0,043
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	6	<b>0,044</b>	0,004	0,002	9,54	0,040-0,052	0,043
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>0,049</b>	0,004	0,002	8,51	0,044-0,055	0,047
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>0,041</b>	0,003	0,001	7,25	0,038-0,045	0,040
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>0,047</b>	0,008	0,003	17,02	0,038-0,060	0,047
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>0,050</b>	0,007	0,002	13,88	0,041-0,061	0,049
<b>б) Адхеренца перитонеалних макрофага после 30 минута инкубације (<math>OD_{620}</math>)</b>								
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>0,047</b>	0,006	0,002	13,20	0,042-0,058	0,043
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>0,048</b>	0,004	0,002	8,44	0,040-0,052	0,048
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>0,053</b>	0,014	0,005	25,76	0,038-0,082	0,050
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	6	<b>0,044</b>	0,002	0,001	4,62	0,041-0,047	0,045
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>0,051</b>	0,009	0,004	18,51	0,043-0,071	0,047
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>0,042</b>	0,004	0,001	10,08	0,039-0,049	0,041
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>0,049</b>	0,009	0,003	19,16	0,037-0,065	0,049
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>0,047</b>	0,006	0,002	12,90	0,041-0,060	0,045
<b>в) Адхеренца перитонеалних макрофага после 60 минута инкубације (<math>OD_{620}</math>)</b>								
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>0,047</b>	0,005	0,002	11,05	0,041-0,057	0,046
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>0,052</b>	0,003	0,001	6,14	0,048-0,058	0,053
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>0,056</b>	0,015	0,005	26,40	0,043-0,089	0,054
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	6	<b>0,048</b>	0,004	0,002	8,89	0,043-0,055	0,048
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>0,092</b>	0,020	0,007	21,30	0,077-0,128	0,083
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>0,041</b>	0,003	0,001	7,55	0,038-0,046	0,040
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>0,047</b>	0,007	0,003	15,14	0,038-0,059	0,047
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>0,062</b>	0,014	0,005	22,44	0,051-0,093	0,060



**Слика 5.3.1.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на адхеренцу перитонеалних макрофага

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ . (Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе; (\*) статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) у односу на контролну, Se+PTU-IA- групу; (#) статистички значајна разлика међу селендефицитним групама;  $p < 0,05$  у односу на Se-PTU-IA- групу; (‡) статистички значајна разлика између селендефицитних и селенадекватних група са истим третманом инхибиторима дејодиназа;  $p < 0,05$ .

**Табела 5.3.2.а** Статистичка значајност разлика адхеренце перитонеалних макрофага после 10 минута инкубације (*p*-вредност; Студентов т-тест)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,5	0,9	0,6	<b>0,01</b>	0,4	0,3	<b>0,04</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,3	0,2	<b>0,001</b>	0,7	0,1	<b>0,01</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,7	<b>0,008</b>	0,2	0,2	<b>0,03</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				<b>0,05</b>	0,2	0,4	0,1
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					<b>0,001</b>	0,5	0,9
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,07	<b>0,006</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							0,5

**Табела 5.3.2.б** Статистичка значајност разлика адхеренце перитонеалних макрофага после 30 минута инкубације; (*p*-вредност; Студентов т-тест)

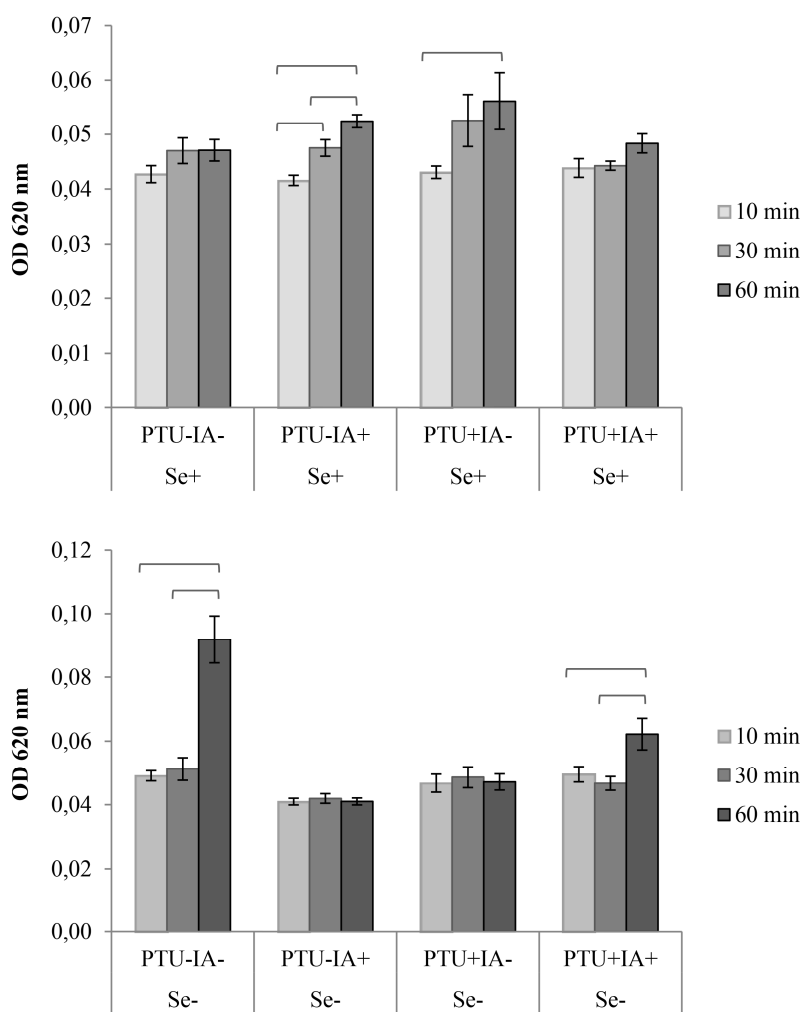
		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,9	0,3	0,3	0,2	0,08	0,7	0,9
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,4	0,1	0,2	<b>0,02</b>	0,8	0,8
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,2	0,5	0,05	0,5	0,3
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				0,2	0,2	0,3	0,4
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					<b>0,03</b>	0,3	0,2
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,09	0,09
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							0,6

**Табела 5.3.2.в** Статистичка значајност разлика адхеренце перитонеалних макрофага после 60 минута инкубације (*p*-вредност; Студентов т-тест)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,1	0,1	0,6	<b>0,001</b>	<b>0,02</b>	1,0	<b>0,02</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,5	0,08	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	0,09	0,09
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,2	<b>0,003</b>	<b>0,01</b>	0,2	0,4
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				<b>0,001</b>	<b>0,007</b>	0,7	<b>0,04</b>
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,007</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,05	<b>0,003</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							<b>0,02</b>

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

Када је анализирана зависност адхеренце од времена инкубације (слика 5.3.2., табела 5.3.3.) показано је да код селенадекватних животиња, поред контролне групе, ни макрофаги пацова који су били третирани са оба инхибитора (Se+PTU+IA+) нису мењали ниво адхеренце у посматраном времену.



**Слика 5.3.2.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на адхеренцу перитонеалних макрофага: временска зависност

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ . (Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе;

(\*) статистички значајна разлика између група

**Табела 5.3.3.** Статистичка значајност разлика адхеренце перитонеалних макрофага: временска зависност (Студентов т-тест, вредност *p*)

	Se+				Se-			
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
10 min/30 min	0,2	<b>0,006</b>	0,07	0,8	0,6	0,6	0,7	0,4
30 min/60 min	1,0	<b>0,03</b>	0,6	0,06	<b>0,000</b>	0,6	0,7	<b>0,01</b>
10 min/60 min	0,1	<b>0,000</b>	<b>0,03</b>	0,1	<b>0,000</b>	1,0	0,9	<b>0,04</b>

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

За разлику од њих, адхезија перитонеалних макрофага пацова третираних само јопаноичном киселином је постепено расла од 10 до 60 минута (регистрован је пораст адхеренце за 14% и 26% након 30 и 60 минута инкубације), док је повећана адхеренца макрофага пацова третираних само пропилтиоурацилом детектована након 60 минута (30% повећања).

Код селендефицитних група пацова пораст адхезије је детектован након 60 минута инкубације и то у групи која није третирана инхибиторима (87% стимулације) и групи која је третирана са оба инхибитора.

#### **5.4. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на целуларност слезине и релативни и апсолутни број основних ћелијских популација: Б и Т лимфоцита и НК ћелија**

С обзиром на то да слезина као највећи секундарни лимфни орган представља значајну компоненту имунског система, у овом раду је испитивано да ли селен и хормони тиреоидне осовине утичу на укупну целуларност слезине (укупан број леукоцита) и заступљеност главних ћелијских популација од значаја за функционисање имунског одговора: Б и Т лимфоцита и НК ћелија. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа испитиван је након 7 недеља третмана. Експресија маркера Б лимфоцита ( $CD3^+CD45RA^+$ ); Т лимфоцита ( $CD3^+$ ) и субпопулација девичанских и ефекторских ( $CD3^+CD45RA^+$ ) и меморијских ( $CD3^+CD45RA^-$ ) Т лимфоцита; као и НК ћелија ( $NKRP1A^+$ ) је анализирана методом проточне цитометрије. Праћен је утицај примењених третмана на релативну заступљеност и апсолутни број наведених ћелијских популација и субпопулација.

##### **5.4.1. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на целуларност слезине – број леукоцита**

Промена броја леукоцита, тј. промена целуларности слезине је један од основних показатеља имуномодулационог дејства испитиваног третмана. Резултати испитивања целуларности слезине пацова су приказани у табели 5.4.1.1., на слици 5.4.1.1. и у табели 5.4.1.2.

Просечан број леукоцита у слезини контролне селенадекватне групе пацова нетретиране инхибиторима дејодиназа (Se+PTU-IA-) износио је  $566 \pm 227 \times 10^6$ . У односу на ову групу, статистички значајно мања целуларност слезине је забележена у свим групама пацова којима је апликован пропилтиоурацил самостално или у комбинацији са јопаноичном киселином. Смањење целуларности у односу на контролну групу је било израженије када су пацови истовремено били изложени и дефициту селена, па је уочено смањење од 48% у Se+PTU+IA- и 44% у Se+PTU+IA+ групи, односно од 73% у

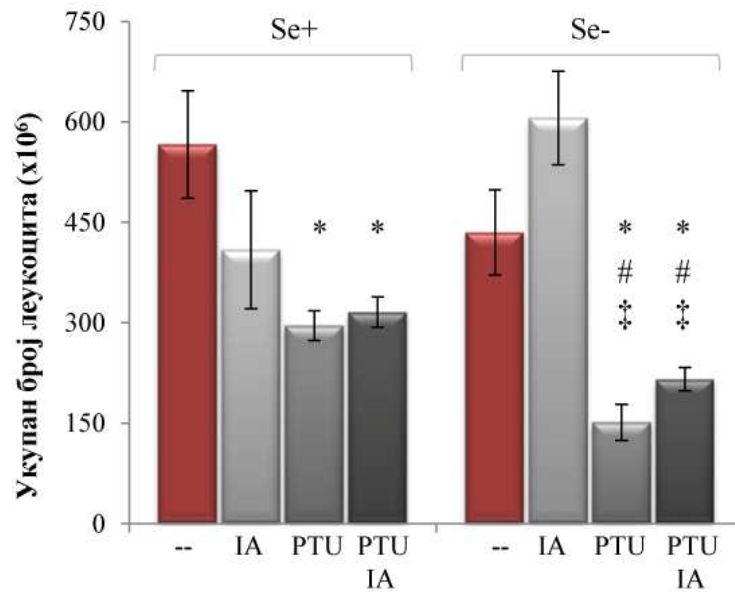
Se-PTU+IA- и 62% у Se-PTU+IA+ групи. Наведене селендефицитне групе су се значајно разликовале и од селендефицитне групе нетретиране инхибиторима дејодиназа (Se-PTU-IA-), са смањењем целуларности од 65% у Se-PTU+IA- и 50% у Se-PTU+IA+ групи.

У истим групама је забележено значајно смањење целуларности слезине и у односу на њихов одговарајући селенадекватан пар, од 49% у Se-PTU+IA- групи и 32% у Se-PTU+IA+ групи.

**Табела 5.4.1.1.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на целуларност слезина пацова (укупан број леукоцита) након седам недеља третмана. Број ћелија је приказан у милионима ( $\times 10^6$ )

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>566</b>	227	80	40	213-867	621
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>409</b>	234	88	57	126-710	437
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>295</b>	63	22	21	192-378	293
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>315</b>	64	23	20	254-440	289
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>435</b>	179	63	41	215-694	433
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>606</b>	198	70	33	335-804	659
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>151</b>	77	27	51	83-319	144
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>215</b>	49	17	23	132-261	216





**Слика 5.4.1.1.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на целуларност слезина пацова (укупан број леукоцита) након седам недеља третмана

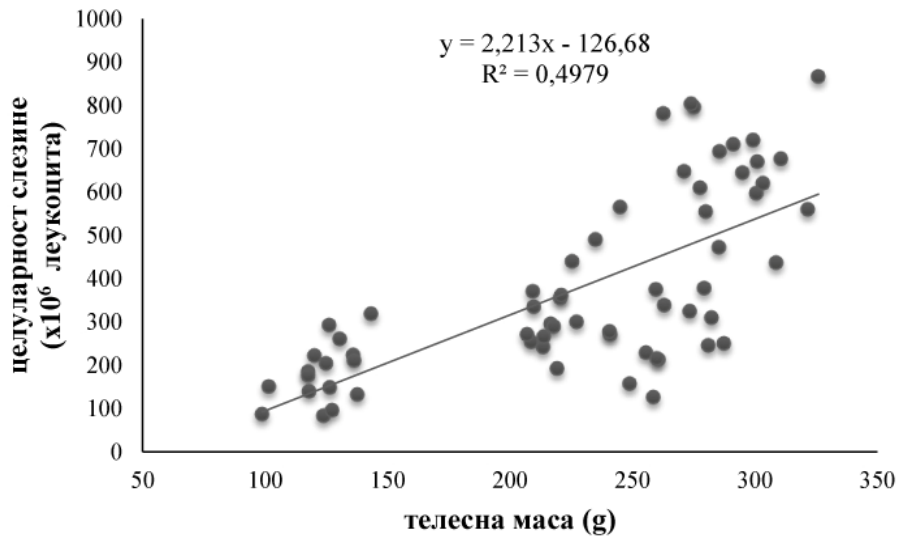
Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ . (Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе; (\*) статистички значајна разлика у односу на контролну, Se+PTU-IA- групу; (#) статистички значајна разлика међу селендефицитним групама;  $p < 0,05$  у односу на Se-PTU-IA- групу; (‡) статистички значајна разлика између селендефицитних и селенадекватних група са истим третманом инхибитора дејодиназа;  $p < 0,05$ .

**Табела 5.4.1.2.** Статистичка значајност разлика целуларности слезина пацова након седам недеља третмана (Студентов т-тест, вредност  $p$ )

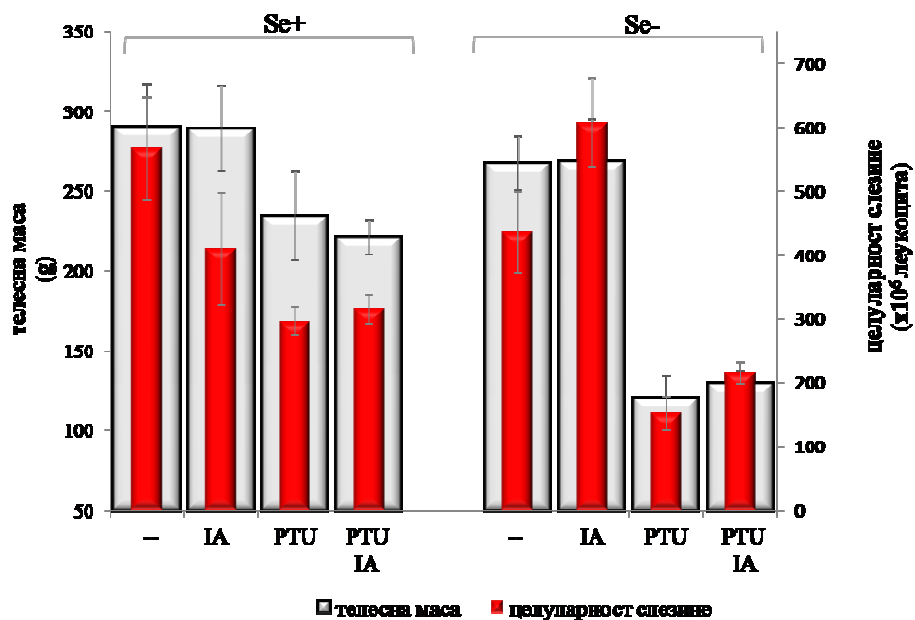
	Se+			Se-				
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,2	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	0,2	0,7	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,3	0,3	0,8	0,1	<b>0,03</b>	0,07
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,5	0,07	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,013</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				0,1	<b>0,004</b>	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,09	<b>0,002</b>	<b>0,010</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						<b>0,000</b>	<b>0,001</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							0,07

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

Промена целуларности слезине је била у високој корелацији са променом телесне масе животиња ( $n=63$ ;  $r=0,71$ ;  $p < 0,001$ ) (слика 5.4.1.2. и 5.4.1.3.).



Слика 5.4.1.2. Корелација телесне масе и целуларности слезина пацова након 7 недеља третмана ( $n=63$ )



Слика 5.4.1.3. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на телесну масу и целуларност слезина пацова

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SD$  за телесну масу и  $\bar{x} \pm SE$  за целуларност слезине

#### **5.4.2. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупан број леукоцита слезине) и апсолутни број Б лимфоцита у слезинама пацова**

Процентуална заступљеност популације Б лимфоцита је одређивана на слезинама пацова узоркованим након седам недеља огледа, методом проточне цитометрије и затим је на основу укупне целуларности слезине израчунаван њихов број. Добијени резултати указују на изражен модулаторни утицај примењених третмана на популацију Б ћелија слезине (табела 5.4.2.1.а и 5.4.2.1.б; табела 5.4.2.2.а и 5.4.2.2.б; слика 5.4.2.).

Процентуална заступљеност популације Б лимфоцита у контролној селенадекватној групи (Se+PTU-IA-) износила је  $10,1 \pm 5,2\%$  и разликовала се од свих осталих група у огледу. Статистички значајно смањење процентуалне заступљености Б лимфоцита у односу на контролну групу, са вредностима у опсегу од  $1,6 \pm 0,8\%$  (Se+PTU+IA+ група) до  $3,8 \pm 1,5\%$  (Se-PTU-IA- група) забележено је у свим огледним групама, осим у селендефицидној групи у којој су пацовима апликована оба инхибитора дејодиназа (Se-PTU+IA+). У овој групи је забележена највећа процентуална заступљеност Б лимфоцита ( $17,2 \pm 7,2\%$ ), значајно већа него у свим осталим огледним групама. Тако је овде проценат Б лимфоцита био око 1,7 пута већи него у контролној Se+PTU-IA- групи; 4,5 пута већи него у селендефицидној Se-PTU-IA- групи и око 11 пута већи него у одговарајућем селенадекватном пару, Se+PTU+IA+ групи.

На самостални утицај дефицита селена на релативну заступљеност Б лимфоцита указује то што се селендефицидна група нетретирана инхибиторима дејодиназа (Se-PTU-IA-) значајно разликовала од своје селенадекватне контроле (Se+PTU-IA-), са забележеним 2,7 пута мањим релативним садржајем популације Б лимфоцита ( $3,8 \pm 1,5\%$ ).

На основу података о укупној целуларности и процентуалној заступљености популације Б лимфоцита, израчунат је и њихов апсолутни број у слезини и значајност разлика између група (табела 5.4.2.1.б, табела 5.4.2.2.б, слика 5.4.2.).

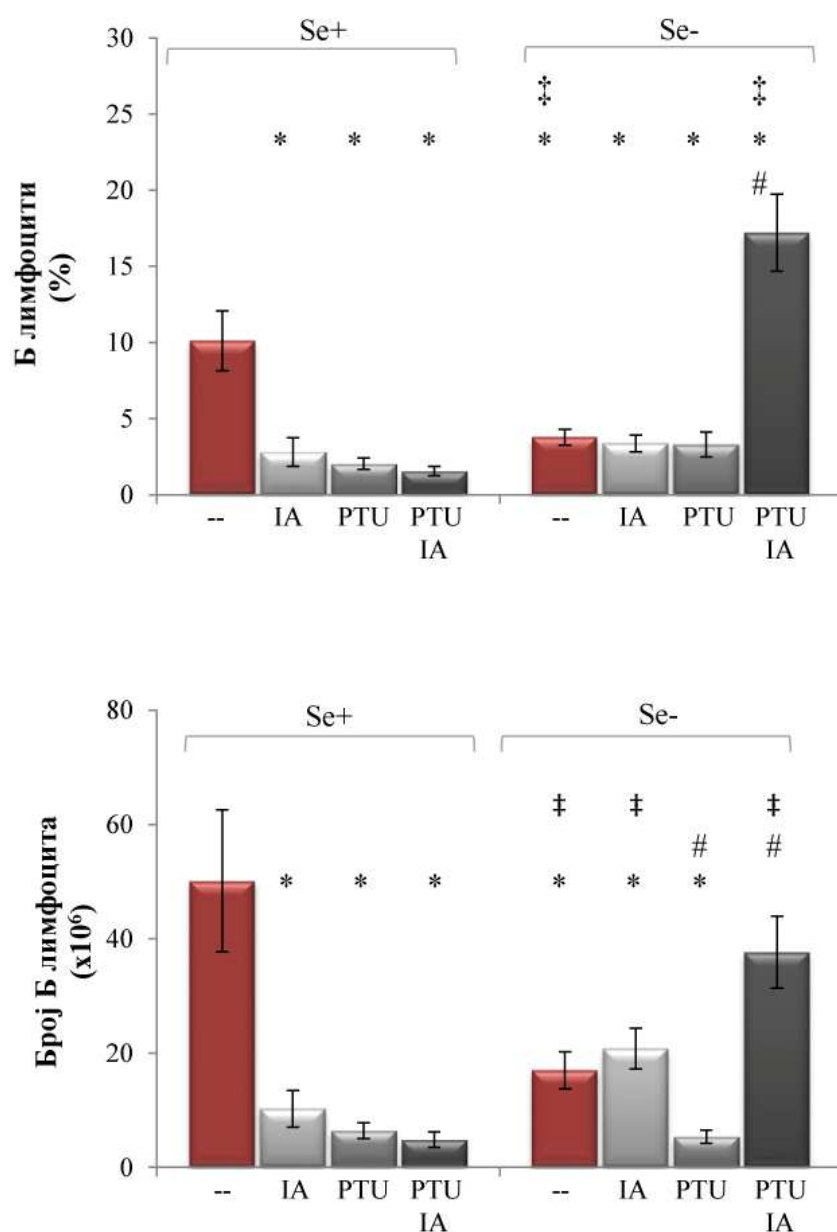
**Табела 5.4.2.1.a** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативну заступљеност Б лимфоцита у слезинама пацова (% у односу на укупну целуларност слезине), након седам недеља третмана

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>10,1</b>	5,2	2,0	51,5	4,7-17,6	8,2
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>2,8</b>	2,5	0,9	88,5	0,8-8,0	1,9
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	5	<b>2,0</b>	0,8	0,4	40,8	0,7-2,9	2,1
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>1,6</b>	0,8	0,3	49,2	0,3-2,3	2,1
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>3,8</b>	1,5	0,5	39,5	1,7-6,5	3,6
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>3,4</b>	1,5	0,6	43,5	1,3-5,2	3,7
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	5	<b>3,3</b>	1,8	0,8	56,1	1,8-4,1	2,8
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>17,2</b>	7,2	2,5	41,6	1,8-24,4	19,8

**Табела 5.4.2.1.б** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на апсолутни број Б лимфоцита у слезинама пацова након седам недеља третмана; број ћелија је приказан у милионима ( $\times 10^6$ )

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>50</b>	33	12	66	20-119	37
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>10</b>	9	3	84	2-24	9
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	5	<b>6</b>	3	1	48	2-11	6
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>5</b>	3	1	61	1-9	6
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>17</b>	9	3	54	4-28	19
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>21</b>	9	4	45	8-36	18
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	5	<b>5</b>	3	1	48	3-6	6
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>38</b>	18	6	47	3-50	42

Највећи просечан број Б лимфоцита је забележен у контролној селенадекватној групи, са вредношћу од  $50 \pm 33 \times 10^6$ . У свим осталим селенадекватним групама број Б ћелија је био статистички значајно мањи него у контролној групи (~ 5, 8 и 10 пута мањи у Se+PTU-IA+, Se+PTU+IA- и Se+PTU+IA+ групи, респективно).



**Слика 5.4.2.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупну целуларност слезине) и апсолутни број Б лимфоцита у слезинама пацова након седам недеља третмана

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ . (Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе; (\*) статистички значајна разлика у односу на контролну, Se+PTU-IA- групу; (#) статистички значајна разлика међу селендефицитним групама;  $p < 0,05$  у односу на Se-PTU-IA- групу; (‡) статистички значајна разлика између селендефицитних и селенадекватних група са истим третманом инхибитора дејодиназа;  $p < 0,05$

**Табела 5.4.2.2.a** Статистичка значајност разлика релативног садржаја Б лимфоцита (% у односу на укупну целуларност слезине) у слезинама пацова након седам недеља третмана (Студентов т-тест, вредност *p*)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	<b>0,009</b>	<b>0,006</b>	<b>0,005</b>	<b>0,018</b>	<b>0,013</b>	<b>0,013</b>	<b>0,046</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,5	0,2	0,4	0,6	0,7	<b>0,000</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,3	<b>0,02</b>	<b>0,07</b>	0,2	<b>0,000</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				<b>0,004</b>	<b>0,02</b>	0,1	<b>0,000</b>
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,6	0,6	<b>0,001</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,9	<b>0,001</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							<b>0,001</b>

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

**Табела 5.4.2.2.б** Статистичка значајност разлика у апсолутном броју Б лимфоцита у слезинама пацова након седам недеља третмана (Студентов т-тест, Mann-Whitney U-тест, вредност *p*)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	0,4
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,3	0,2	0,2	<b>0,05</b>	0,2	<b>0,003</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,6	<b>0,01</b>	<b>0,006</b>	0,6	<b>0,001</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				<b>0,008</b>	<b>0,004</b>	1,0	<b>0,001</b>
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,5	<b>0,008</b>	<b>0,02</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						<b>0,004</b>	<b>0,04</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							<b>0,001</b>

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

У свим селендефицитним групама просечан број Б лимфоцита је такође био мањи него у селенадекватној контролној групи (редом за 66%; 58%; 90% и 24% у Se-PTU-IA-, Se-PTU-IA+, Se-PTU+IA- и Se-PTU+IA+ групи). Ова разлика ипак није била статистички значајна у селендефицитној групи којој су апликована оба инхибитора (Se-PTU+IA+). У овој групи (Se-PTU+IA+) је забележено значајно повећање броја Б лимфоцита (за 123%) у односу на Se-PTU-IA- групу.

Између свих група са истим третманом инхибиторима дејодиназа и различитим статусом селена, осим група третираних само пропилтиоурацилом, забележена је значајна разлика у апсолутном броју Б лимфоцита (слика 5.4.2., табела 5.4.2.2.б). Сам дефицит селена без примене инхибитора (Se-PTU-IA-) је узроковао смањење апсолутног броја Б лимфоцита у односу на контролну селенадекватну групу (Se+PTU-IA-). Са друге стране, у селендефицитним групама у којима је примењивана јопаноична киселина (Se-PTU-IA+ и Se-PTU+IA+) забележен је већи апсолутни број Б лимфоцита, и то за 110% у Se-PTU-IA+ групи и 7,6 пута у Se-PTU+IA+ групи, у односу на одговарајући селенадекватан пар.

### **5.4.3. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупан број леукоцита слезине) и апсолутни број укупних Т лимфоцита у слезинама пацова**

Резултати испитивања утицаја примењених третмана на релативни садржај и број Т лимфоцита су приказани у табелама 5.4.3.1.а и 5.4.3.1.б, табелама 5.4.3.2.а и 5.4.3.2.б и на слици 5.4.3.

Процентуална заступљеност укупних Т лимфоцита у контролној селенадекватној групи (Se+PTU-IA-) износила је  $55,0 \pm 10,0\%$ . Статистички значајно већа заступљеност Т ћелија у слезини у односу на контролну групу је забележена у селенадекватној и селендефицитној групи које су третиране пропилтиоурацилом, са просечним релативним садржајем ове популације од  $73,3 \pm 3,2\%$  (Se+PTU+IA-) односно  $73,3 \pm 12,8\%$  (Se-PTU+IA-), као и у селенадекватној групи третираној јопаноичном киселином, са  $79,3 \pm 6,4\%$  (Se+PTU-IA+). Није забележена значајност разлика у проценту Т лимфоцита између селендефицитних група.

Број Т лимфоцита у контролној групи (Se+PTU-IA-) износио је  $296 \pm 150 \times 10^6$ . Између селенадекватних група нису забележене значајне разлике у броју укупних Т лимфоцита. Примена пропилтиоурацила са или без јопаноичне киселине у селенадекватним условима довела је до смањења броја Т лимфоцита слезине за 23,4% у Se+PTU+IA- групи и 45,3% у Se+PTU+IA+

групи, али ова разлика није била статистички значајна у односу на контролу (за групу Se+PTU+IA+ је била близу границе статистичке значајности;  $p=0,07$ ).

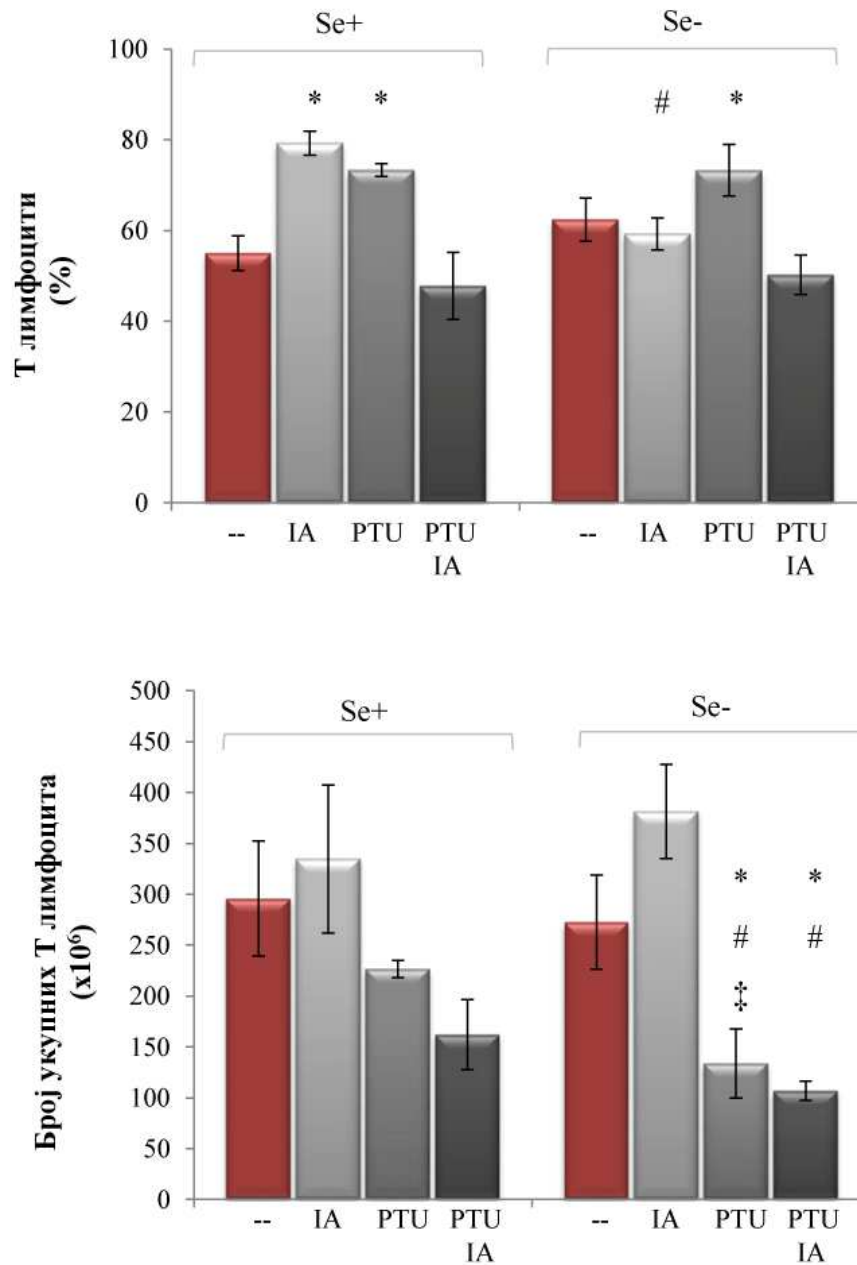
**Табела 5.4.3.1.a** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативну заступљеност Т лимфоцита у слезинама пацова (% у односу на укупну целуларност слезине), након седам недеља третмана

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>55,0</b>	10,1	3,8	18,3	39,2-71,4	54,2
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	6	<b>79,3</b>	6,4	2,6	8,1	68,7-87,4	78,9
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	5	<b>73,3</b>	3,2	1,4	4,4	69,5-77,4	73,5
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>47,8</b>	19,6	7,4	41,1	17,8-68,3	47,5
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>62,4</b>	13,4	4,7	21,5	44,1-79,5	62,5
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>59,3</b>	9,3	3,5	15,7	44,2-68,3	61,5
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	5	<b>73,3</b>	12,8	5,7	17,4	56,4-85,1	80,5
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>50,2</b>	12,4	4,4	24,6	42,8-80,5	46,3

**Табела 5.4.3.1.б** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на апсолутни број Т лимфоцита у слезинама пацова након седам недеља третмана; број ћелија је приказан у милионима ( $\times 10^6$ )

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	<b>296</b>	150	57	51	103-514	300
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	6	<b>335</b>	178	73	53	110-552	384
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	5	<b>227</b>	19	8	8	210-258	218
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>162</b>	91	35	57	47-300	142
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>273</b>	131	46	48	108-485	262
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>381</b>	123	46	32	217-543	399
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	5	<b>134</b>	76	34	57	82-260	95
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>107</b>	27	9	25	61-143	106





**Слика 5.4.3.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупну целуларност слезине) и апсолутни број Т лимфоцита у слезинама пацова након седам недеља третмана

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ . (Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе; (\*) статистички значајна разлика у односу на контролну, Se+PTU-IA- групу; (#) статистички значајна разлика међу селендефицитним групама;  $p < 0,05$  у односу на Se-PTU-IA- групу; (‡) статистички значајна разлика између селендефицитних и селенадекватних група са истим третманом инхибиторима дејодиназа;  $p < 0,05$

**Табела 5.4.3.2.а** Статистичка значајност разлика релативног садржаја (% у односу на укупну целуларност слезине) Т лимфоцита у слезинама пацова након седам недеља третмана (Студентов т-тест, вредност *p*)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	0,4	0,2	0,4	<b>0,03</b>	0,4
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,08	<b>0,005</b>	<b>0,01</b>	<b>0,001</b>	0,4	<b>0,001</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			<b>0,013</b>	0,06	<b>0,006</b>	1,0	<b>0,001</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				0,13	0,2	<b>0,02</b>	0,8
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,6	0,2	0,08
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,08	0,1
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							<b>0,01</b>

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

**Табела 5.4.3.2.б** Статистичка значајност разлика апсолутног броја Т лимфоцита у слезинама пацова након седам недеља третмана (Студентов т-тест, вредност *p*)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,7	0,3	0,07	0,8	0,3	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,2	0,07	0,5	0,6	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,1	0,4	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>	<b>0,000</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				0,08	<b>0,003</b>	0,6	0,2
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,1	<b>0,03</b>	<b>0,01</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						<b>0,002</b>	<b>0,001</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							0,5

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

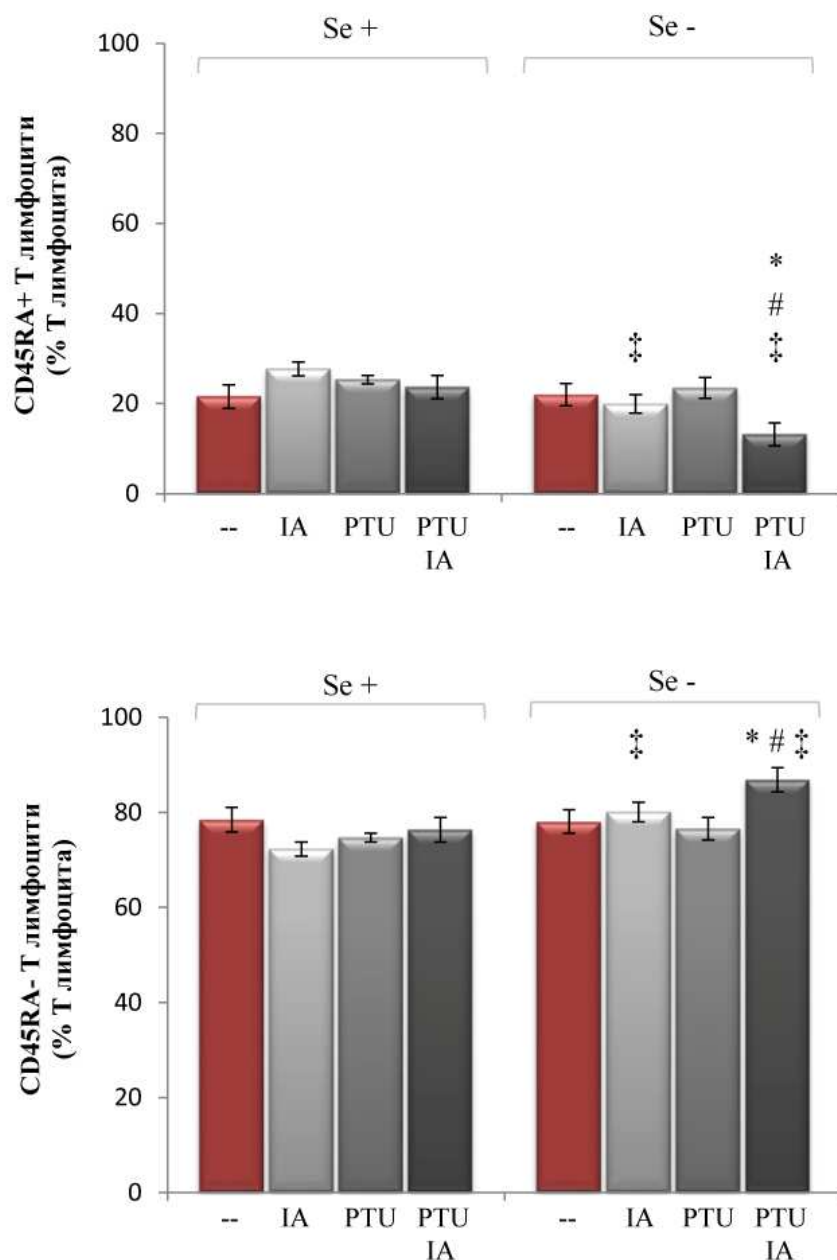
Међутим, селендефицитне групе са овим третманом инхибиторима дејодиназа значајно су се разликовале од контролне селенадекватне групе, са бројем Т лимфоцита мањим за 55% у Se-PTU+IA-, односно 64% у Se-PTU+IA+ групи у односу на контролу. Исте селендефицитне групе су имале и значајно мањи просечан број Т лимфоцита у односу на селендефицитну групу нетретирану инхибиторима дејодиназа (Se-PTU-IA-) и то за око 51% (Se-PTU+IA- група) и за 61% (Se-PTU+IA+ група).

Уколико се упореде резултати добијени у групама са истим третманом инхибиторима дејодиназа, уочава се да дефицит селена доприноси смањењу броја Т лимфоцита у односу на селенадекватну контролу, у свим групама осим када је јопаноична киселина самостално примењена. Тако је у селендефицитној групи пацова којима је давана само јопаноична киселина (Se-PTU-IA+), просечан број Т лимфоцита био је за 28% већи него у њеном селенадекватном пару (Se+PTU-IA+), али разлика није била статистички значајна. Једина значајност разлика између група са истим третманом инхибиторима је забележена између Se+PTU+IA- и Se-PTU+IA- групе, са смањењем од 41% у групи са дефицитом селена.

#### **5.4.4. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупну популацију Т лимфоцита) CD45RA<sup>+</sup> и CD45RA<sup>-</sup> субпопулација Т лимфоцита у слезинама пацова**

У огледу су праћене две субпопулације Т лимфоцита, разликоване на основу експресије маркера CD45RA. Однос субпопулација у укупној популацији Т лимфоцита слезине приказан је на слици 5.4.4.

У свим огледним групама је CD45RA<sup>-</sup> субпопулација (меморијски Т лимфоцити) била доминантна у односу на субпопулацију CD45RA<sup>+</sup> ћелија (девичански и ефекторски Т лимфоцити). Разлика у односу на контролну групу је забележена у селендефицитној групи која је третирана истовремено са оба инхибитора дејодиназа, у којој је релативна заступљеност популације наивних и ефекторских Т ћелија (CD45RA<sup>+</sup>) била смањена, односно повећана заступљеност популације меморијских (CD45RA<sup>-</sup>) Т лимфоцита (табеле 5.4.4.а и 5.4.4.б). Ова група се разликовала и од своје селенадекватне контроле и од селендефицитне нетретиране групе.



**Слика 5.4.4.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативну заступљеност CD45RA+ и CD45RA- субпопулација Т лимфоцита у односу на укупну популацију Т лимфоцита слезине, након седам недеља третмана

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ . (Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе; (\*) статистички значајна разлика у односу на контролну, Se+PTU-IA- групу; (#) статистички значајна разлика међу селендефицитним групама;  $p < 0,05$  у односу на Se-PTU-IA- групу; (‡) статистички значајна разлика између селендефицитних и селенадекватних група са истим третманом инхибиторима дејодиназа;  $p < 0,05$

**Табела 5.4.4.а** Статистичка значајност разлика релативног садржаја (%) CD45RA<sup>+</sup> субпопулације Т лимфоцита у односу на укупну популацију Т лимфоцита слезине, након седам недеља третмана (Студентов т-тест, вредност *p*)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,07	0,2	0,6	0,9	0,9	0,1	<b>0,04</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,2	0,2	0,1	<b>0,01</b>	0,2	<b>0,000</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,6	0,2	<b>0,05</b>	0,5	<b>0,002</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				0,6	0,5	0,1	<b>0,01</b>
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,4	0,4	<b>0,04</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,1	0,06
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							<b>0,01</b>

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

**Табела 5.4.4.б** Статистичка значајност разлика релативног садржаја (%) CD45RA<sup>-</sup> субпопулације Т лимфоцита у односу на укупну популацију Т лимфоцита слезине, након седам недеља третмана (Студентов т-тест, вредност *p*)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,07	0,2	0,6	0,9	0,9	0,1	<b>0,04</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,2	0,2	0,1	<b>0,01</b>	0,2	<b>0,000</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,6	0,2	<b>0,05</b>	0,5	<b>0,002</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				0,6	0,5	0,1	<b>0,01</b>
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,4	0,4	<b>0,04</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,1	0,06
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							<b>0,01</b>

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

#### **5.4.5. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупан број леукоцита слезине) и апсолутни број NK ћелија у слезинама пацова**

Процентуална заступљеност и укупан број NK ћелија у слезинама пацова одређивани су у циљу процене модуlatorног дејства селена и хормона тиреоидне осовине на неспецифични имунитет. Резултати испитивања су приказани у табели 5.4.5.1.а и 5.4.5.1.б; табели 5.4.5.2.а и 5.4.5.2.б, и на слици 5.4.5.

Процент NK ћелија у контролној селенадекватној групи (Se+PTU-IA-) био је  $16,2 \pm 2,1\%$ . Третман појединачним инхибиторима дејодиназа није значајно утицао на проценат NK ћелија у селенадекватним групама. Примена оба инхибитора је довела до статистички значајног смањења процентуалне заступљености NK ћелија у Se+PTU+IA+ групи у односу на контролну Se+PTU-IA- групу, са релативним садржајем од  $9,1 \pm 4,2\%$ , што је најмања забележена вредност од свих група у огледу. У осталим селенадекватним групама је проценат NK ћелија био уједначен и није се разликовао од контролне групе.

Дефицит селена без примене инхибитора дејодиназа (Se-PTU-IA-) довео је до значајног смањења процента NK ћелија у слезинама у односу на контролну селенадекватну (Se+PTU-IA-) групу, са просечном вредношћу у овој групи од  $11,1 \pm 3,5\%$ .

У оквиру група са дефицитом селена, просечна процентуална заступљеност NK ћелија је била статистички значајно већа у групама пацова којима је даван пропилтиоурацил и то 1,5 пута већа у Se-PTU+IA- и 1,4 пута у Se-PTU+IA+ групи, у односу на селендефицитну нетретирану групу.

Анализом резултата добијених у групама са истим третманом инхибиторима дејодиназа и различитим статусом селена, уочава се већ наведена значајност разлика између група нетретираних инхибиторима дејодиназа, али и између група третираних са оба инхибитора. При томе је, за разлику од нетретираних група, код примене оба инхибитора значајно већи

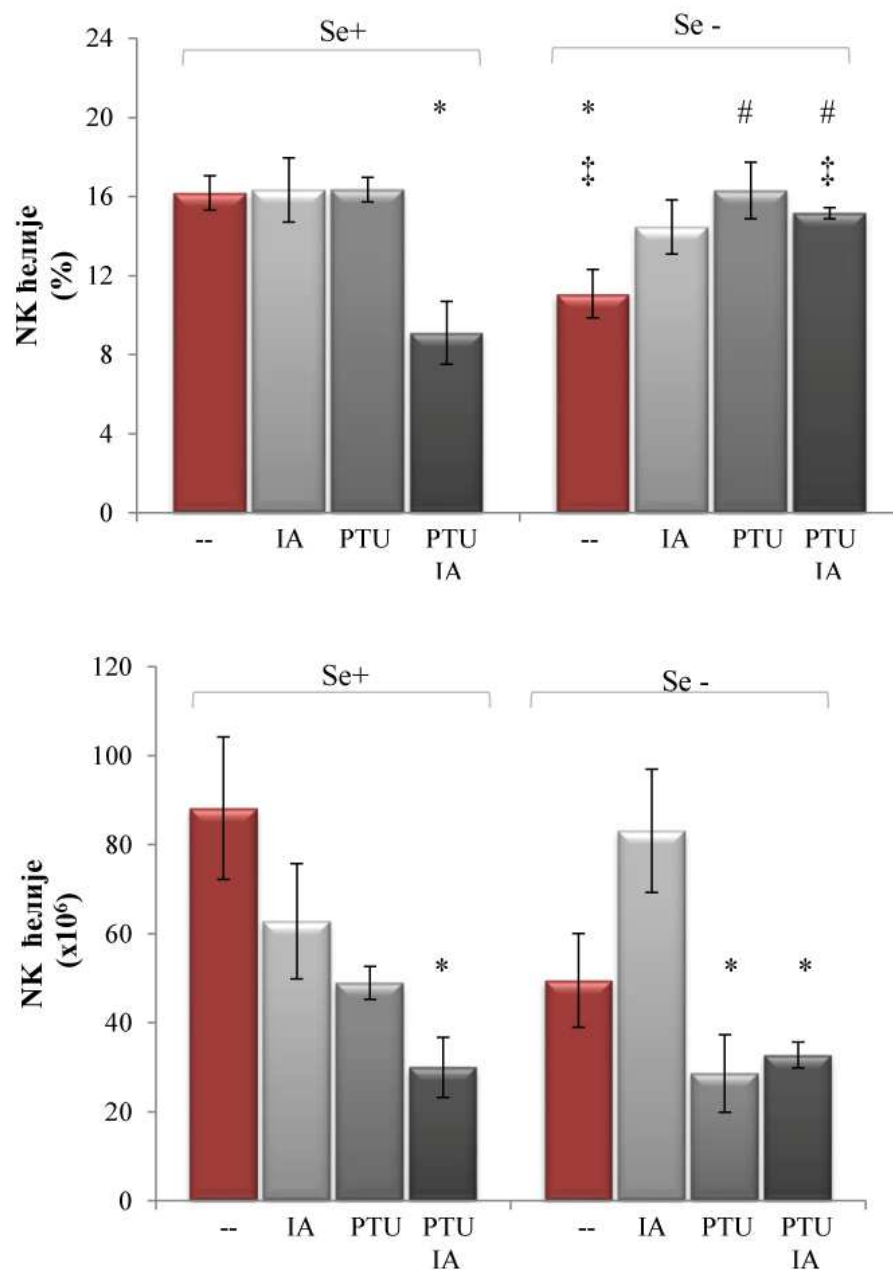
процент НК ћелија забележен у селендефицидној (Se-PTU+IA+) групи са  $15,2 \pm 0,8\%$ , него у њеном селенадекватном пару (Se+PTU+IA+) са  $9,1 \pm 4,2\%$ .

**Табела 5.4.5.1.а** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативну заступљеност НК ћелија у слезинама пацова (% у односу на укупну целуларност слезине), након седам недеља третмана

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	6	<b>16,2</b>	2,1	0,9	13,3	12,9-18,4	16,5
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>16,3</b>	4,3	1,6	26,3	11,3-24,5	14,9
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	6	<b>16,3</b>	1,5	0,6	9,4	14,3-19,0	16,2
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>9,1</b>	4,2	1,6	46,2	2,8-13,4	10,1
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>11,1</b>	3,5	1,2	31,4	6,8-18,1	10,5
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>14,5</b>	3,6	1,4	25,0	10,0-19,7	14,4
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	6	<b>16,3</b>	3,5	1,4	21,5	13,1-21,8	15,4
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>15,2</b>	0,8	0,3	5,4	14,4-16,6	14,8

**Табела 5.4.5.1.б** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на апсолутни број НК ћелија у слезинама пацова након седам недеља третмана; број ћелија је приказан у милионима ( $\times 10^6$ )

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	6	<b>88</b>	39	16	44	39-124	103
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>63</b>	34	13	54	23-111	63
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	6	<b>49</b>	9	4	18	39-60	50
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>30</b>	17	7	58	7-59	30
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>50</b>	30	11	60	19-110	42
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>83</b>	37	14	44	40-154	71
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	6	<b>29</b>	21	9	75	13-69	20
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>33</b>	8	3	25	20-38	32



**Слика 5.4.5.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (% у односу на укупну целуларност слезине) и апсолутни број НК ћелија у слезинама пацова након седам недеља третмана

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ . (Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе; (\*) статистички значајна разлика у односу на контролну, Se+PTU-IA- групу; (#) статистички значајна разлика међу селендефицитним групама;  $p < 0,05$  у односу на Se-PTU-IA- групу; (‡) статистички значајна разлика између селендефицитних и селенадекватних група са истим третманом инхибиторима дејодиназа;  $p < 0,05$



**Табела 5.4.5.2.а** Статистичка значајност разлика релативног садржаја (% у односу на укупну целуларност слезине) NK ћелија у слезинама пацова након седам недеља третмана (Студентов т-тест, вредност *p*)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,9	0,9	<b>0,003</b>	<b>0,006</b>	0,3	1,0	0,3
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		1,0	<b>0,008</b>	<b>0,03</b>	0,4	1,0	0,5
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			<b>0,003</b>	<b>0,003</b>	0,2	1,0	0,1
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				0,3	<b>0,03</b>	<b>0,006</b>	<b>0,008</b>
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,09	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,4	0,6
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							0,5

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

**Табела 5.4.5.2.б** Статистичка значајност разлика апсолутног броја NK ћелија у слезинама пацова након седам недеља третмана (Студентов Т-тест, вредност *p*)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,2	0,06*	<b>0,01</b>	0,07	0,8	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,3	<b>0,05</b>	<b>0,4</b>	0,3	0,05	0,06
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			<b>0,03</b>	1,0	<b>0,049</b>	0,07	<b>0,006</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				0,1	<b>0,008</b>	0,9	0,7
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,08	0,2	0,2
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						<b>0,008</b>	<b>0,01</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							0,7

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

Број NK ћелија је израчунат по истом принципу као и број ћелија осталих популација. У контролној групи, број NK ћелија био је  $88 \pm 39 \times 10^6$ . У свим селенадекватним групама је забележено смањење броја NK ћелија у односу на селенадекватну контролну групу, са статистичком значајношћу забележеном само у селенадекватној групи третираној са оба инхибитора дејодиназа (Se+PTU+IA+), где је број NK ћелија био смањен за 70%.

Разлика између селенадекватне контролне групе и селенадекватне групе третиране пропилтиоурацилом (Se+PTU+IA-) била је близу границе

статистичке значајности ( $p=0,06$ ), са бројем NK ћелија у овој групи мањим за 66% од контролне Se+PTU-IA- групе. Од селенадекватне контролне групе су се разликовале и селендефицидне групе третиране пропиљтиоурацилом (Se-PTU+IA- и Se-PTU+IA+), са такође значајно мањим бројем NK ћелија (за 67% и 62,5%, респективно).

Селендефицидне групе се нису међусобно значајно разликовале у броју NK ћелија. Разлика близу границе статистичке значајности ( $p=0,08$ ) је забележена између Se-PTU-IA- и Se-PTU-IA+ групе, при чему је примена јопаноичне киселине у условима дефицита селена позитивно утицала на број NK ћелија, па је њихов број у овој групи био већи за 66% него у Se-PTU-IA- групи.

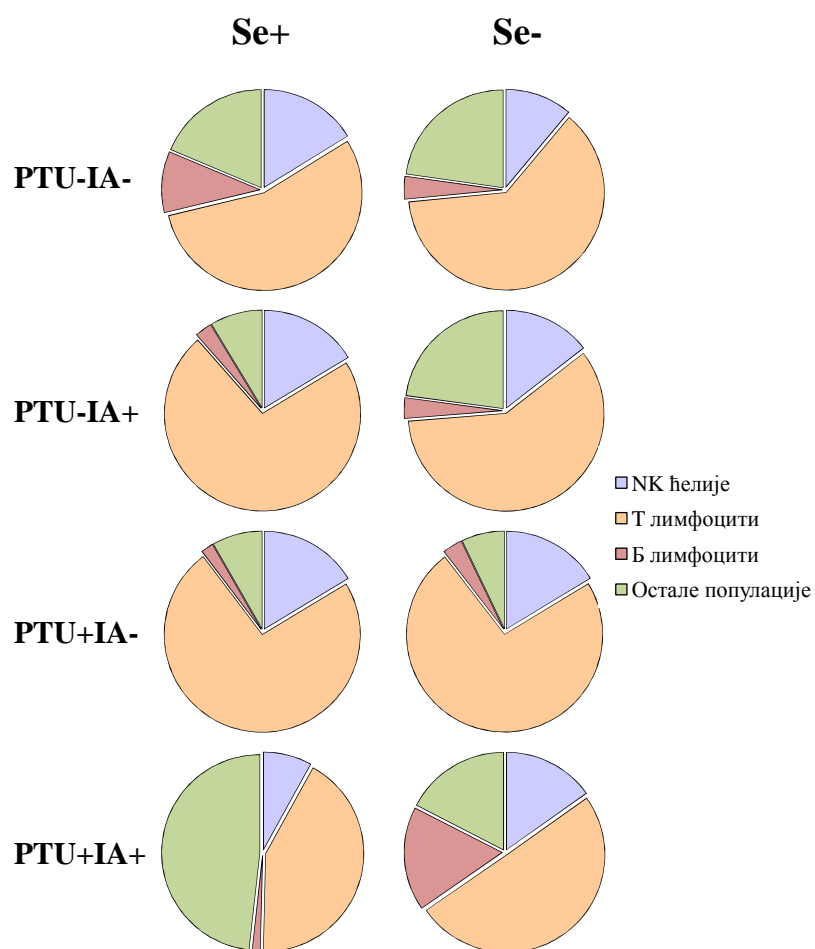
Такође, није забележена значајна разлика између група са истим третманом инхибиторима дејодиназа и различитим статусом селена, али је она била близу границе значајности ( $p=0,07$ ) између група нетретираних инхибиторима дејодиназа (Se+PTU-IA- и Se-PTU-IA-) и група третираних само пропиљтиоурацилом (Se+PTU+IA- и Se-PTU+IA-).

#### **5.4.6. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (%) популације ћелија слезине: Збирни приказ**

Збирни приказ резултата утицаја дефицита селена на релативни садржај (%) популација ћелија слезине показује да, независно од третмана, у ћелијама слезине доминирају Т лимфоцити (слика 5.4.6.). Одступање од овог налаза је нађено само у групама пацова који су били третиран са оба инхибитора, с тим што је ефекат био израженији код селенадекватне у односу на селендефицидну групу.

Популација Б лимфоцита је била мање присутна у слезинама свих група третираних пацова, са изузетком селендефицидне групе која је третирана са оба инхибитора. Релативни садржај NK ћелија се незнатно мењао код третираних у односу на нетретиране групе, са изузетком селенадекватне групе која је третирана са оба инхибитора и селендефицидне нетретиране групе, где је установљена мања заступљеност ове популације ћелија у односу на контролу.

Изразито повећање процентуалне заступљености групе ћелија коју не препознаје ниједно од коришћених моноклонских антитела детектовано је код селенадекватне групе која је третирана са оба инхибитора ( $41,5 \pm 23,4\%$ ) у односу на  $13,5 \pm 8,8\%$ , колико је детектовано у контролној групи. Све остале огледне групе се нису разликовале од контролне групе.



**Слика 5.4.6.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодинази на релативни садржај (%) Т и Б лимфоцита и НК ћелија у слезинама пацова након седам недеља третмана

## **5.5. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на хуморални имунски одговор пацова**

Испитивање утицаја статуса селена и хормона тиреоидне осовине на функцију хуморалног имунског одговора спроведено је одређивањем титра специфичних IgM и IgG антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита (SRBC) у плазми огледних животиња. Титар антитела је одређиван ELISA методом.

### **5.5.1. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар природних и имуних IgM антитела**

Утицај селена и хормона тиреоидне осовине на синтезу/авидитет природних и имуних *pre-switch* IgM антитела процењиван је на основу мерења титра специфичних IgM реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми неимунизованих пацова и у серуму пацова пет дана после имунизације интраперитонеалном апликацијом 10%-не суспензије овчијих еритроцита.

#### **5.5.1.1. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар природних IgM антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми неимунизованих пацова**

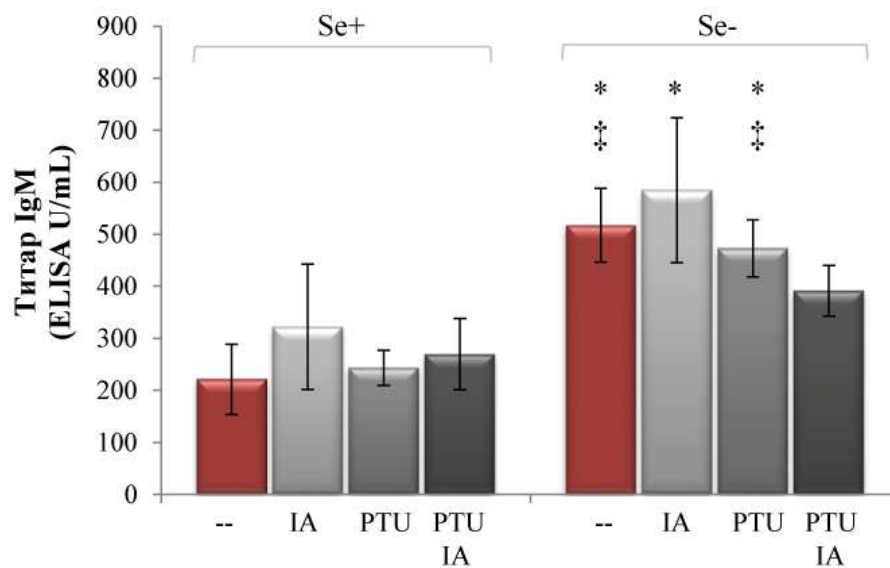
Прво испитивање висине титра специфичних IgM антитела спроведено је код пацова који нису имунизовани суспензијом овчијих еритроцита, с тим што је код свих ових животиња 7 дана пре узимања узорка крви изазивана стерилна инфламација, интраперитонеалном апликацијом тиогликолатног медијума, у сврху испитивања функције перитонеалних макрофага. Испитивање је спроведено након три недеље третмана, што је период за који је доказано физиолошко увођење у хипотиреоидизам применом инхибитора дејодиназа, и увођење организма у статус дефицита селена у групама са селендефицитном исхраном (табела 5.1.1.).

Код свих огледних неимунизованих пацова је измерен релативно висок титар ових антитела, при чему је у свим групама била јако изражена индивидуална варијабилност у постигнутој висини титра (слика 5.5.1.1., табела 5.5.1.1.1., табела 5.5.1.1.2.). Уочено је и да су у селендефицитним групама забележени виши просечни титри природних IgM у односу на селенадекватне групе. Титар природних IgM реактивних са SRBC у контролној групи био је  $221 \pm 178$  U/mL. Просечни титар IgM је у свим селендефицитним групама био виши него у селенадекватној контролној групи и то за 134%, 165%, 114% и 77% у Se-PTU-IA-, Se-PTU-IA+, Se-PTU+IA- и Se-PTU+IA+ групи, респективно. И поред високих коефицијената варијације, ова разлика је била статистички значајна за све групе осим Se-PTU+IA+ групе, где је била близу границе значајности ( $p=0,06$ ).

Ни између селенадекватних, нити између селендефицитних група није забележена статистички значајна разлика у титру IgM као последица различитог третмана инхибиторима дејодиназа.

**Табела 5.5.1.1.1.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар природних IgM антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита, код неимунизованих пацова (ELISA U/mL)

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	221	178	67	81	40-488	237
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	6	322	296	121	92	126-876	182
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	243	96	34	39	140-397	232
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	7	269	182	69	67	60-535	249
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	7	508	160	60	33	266-726	457
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	8	585	395	140	68	138-1104	493
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	7	473	145	55	31	202-605	522
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	391	138	49	35	108-551	422



**Слика 5.5.1.1.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар природних IgM антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита (SRBC) у плазми неимунизованих пацова

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ . (Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе; (\*) статистички значајна разлика у односу на контролну, Se+PTU-IA- групу; (#) статистички значајна разлика међу селендефицитним групама;  $p < 0,05$  у односу на Se-PTU-IA- групу; (‡) статистички значајна разлика између селендефицитних и селенадекватних група са истим третманом инхибитора дејодиназа;  $p < 0,05$

**Табела 5.5.1.1.2.** Статистичка значајност разлика између титара природних IgM антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита (Студентов Т-тест, вредност  $p$ )

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,5	0,8	0,6	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>0,01</b>	0,06
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,6	0,7	0,2	0,2	0,3	0,6
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,7	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>	<b>0,005</b>	<b>0,03</b>
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				<b>0,03</b>	0,07	<b>0,04</b>	0,2
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,7	0,6	0,2
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,5	0,2
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							0,3

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

Резултати добијени у групама са једнаким третманом инхибиторима дејодиназа и различитим статусом селена показују да је титар IgM увек био

виши у селендефицитној групи у односу на њен селенадекватни пар. Ова разлика је била статистички значајна између контролне Se+PTU-IA- и селендефицитне, Se-PTU-IA- групе у којој је титар био већи за 134%, као и између група третираних само пропиљтиоурацилом, са титром IgM већим за 95% у селендефицитној групи. Између осталих група није забележена значајност, иако је титар ових антитела био виши за 82% у Se-PTU-IA+ и 45% у Se-PTU+IA+ групи, у односу на одговарајући селенадекватан пар.

#### 5.5.1.2. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар имуних IgM антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми пацова након примарне имунизације суспензијом овчијих еритроцита

Испитивање висине титра имуних IgM реактивних са антигенима овчијих еритроцита је спроведено пет дана након једнократне имунизације животиња, која је спроведена 32. дана огледа интраперитонеалном апликацијом 10%-не суспензије овчијих еритроцита.

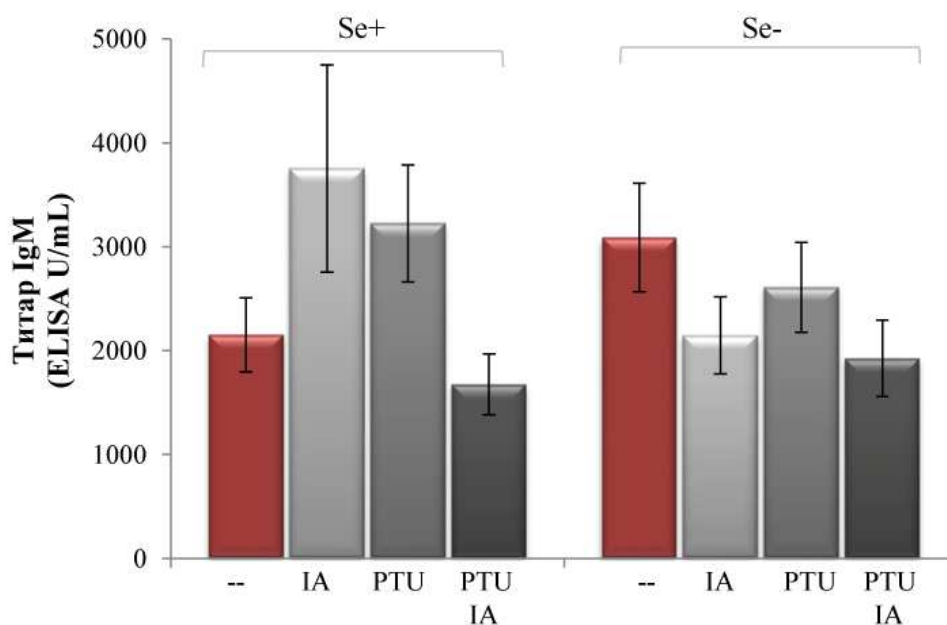
**Табела 5.5.1.2.1.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар имуних IgM реактивних са антигенима овчијих еритроцита, у плазми пацова пет дана након једнократне имунизације 10%-ном суспензијом SRBC. Висина титра је изражена у ELISA U/mL

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>2152</b>	1009	357	47	675-3353	2368
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	<b>3754</b>	2639	997	70	404-8786	3152
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>3226</b>	1594	564	49	1549-3248	2968
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>1675</b>	829	293	49	521-2918	1558
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>3090</b>	1480	523	48	980-6328	2933
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>2147</b>	1049	371	49	646-3164	2501
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	<b>2610</b>	1226	433	47	282-4226	2989
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	8	<b>1926</b>	1038	367	54	570-3155	2015

Титар имуних IgM забележен пет дана након имунизације у контролној селенадекватној групи (Se+PTU-IA-) био је 2152±1009 ELISA U/mL. Највиши

просечни титар ових антитела забележен је у селенадекватној групи третираној јопаноичном киселином ( $3754 \pm 2639$  U/mL), а најнижи у селенадекватној групи третираној са оба инхибитора дејодиназа ( $1675 \pm 829$  U/mL) (табела 5.5.1.2.1.).

Резултате карактерише висока варијабилност у индивидуалном одговору на имунизацију овчијим еритроцитима и последично велики коефицијент варијације (Cv) у свим испитиваним групама (табела 5.5.1.2.1.), што је утицало и на то да разлика у утврђеној висини титра ових антитела између појединачних група нема статистичку значајност (слика 5.5.1.2, табела 5.5.1.2.2.).



**Слика 5.5.1.2.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар имуних IgM антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита (SRBC) у плазми пацова, пет дана након једнократне имунизације 10%-ном суспензијом овчијих еритроцита

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ . (Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе; (\*) статистички значајна разлика у односу на контролну, Se+PTU-IA- групу; (#) статистички значајна разлика међу селендефицитним групама;  $p < 0,05$  у односу на Se-PTU-IA- групу; (‡) статистички значајна разлика између селендефицитних и селенадекватних група са истим третманом инхибиторима дејодиназа;  $p < 0,05$ .

Тако, између контролне групе (Se+PTU-IA) и осталих група у експерименту није постојала статистички значајна разлика у висини титра ових



антитела, као ни између селендефицидне нетретиране групе (Se-PTU-IA-) и осталих селендефицидних група. Резултати добијени у групама са различитим статусом селена и истим третманом инхибиторима дејодиназа такође показују да нема значајних разлика између упоређиваних група које би биле последица различитог статуса селена.

**Табела 5.5.1.2.2.** Статистичка значајност разлика између титара имуних IgM реактивних са антигенима овчијих еритроцита, у плазми пацова пет дана након примарне имунизације суспензијом овчијих еритроцита (Студентов Т-тест, вредност *p*)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,2	0,1	0,3	0,2	1,0	0,4	0,7
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,7	0,1	0,6	0,2	0,3	0,1
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			<b>0,03</b>	0,9	0,1	0,4	0,08
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				<b>0,04</b>	0,3	0,1	0,6
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,2	0,5	0,09
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,4	0,7
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							0,2

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицидне групе

### 5.5.2. Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар IgG антитела

Утицај статуса селена и хормона тиреоидне осовине на секундарни хуморални имунски одговор је процењиван на основу титра IgG реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми пацова. Висина титра ових IgG је испитивана два пута: први пут код неимунизованих животиња и други пут три дана након секундарне имунизације животиња 10%-ном суспензијом овчијих еритроцита.

### 5.5.2.1. Испитивање титра IgG реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми неимунизованих пацова

Као и одређивање титра IgM, прво одређивање титра IgG антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита урађено је након три недеље огледа, на животињама код којих је седам дана раније изазвана стерилна инфламација интраперитонеалном применом тиогликолата. Утврђено је да IgG антитела реактивна са SRBC нису била присутна у плазми неимунизованих пацова, односно нису се могла детектовати примењеним ELISA тестом.

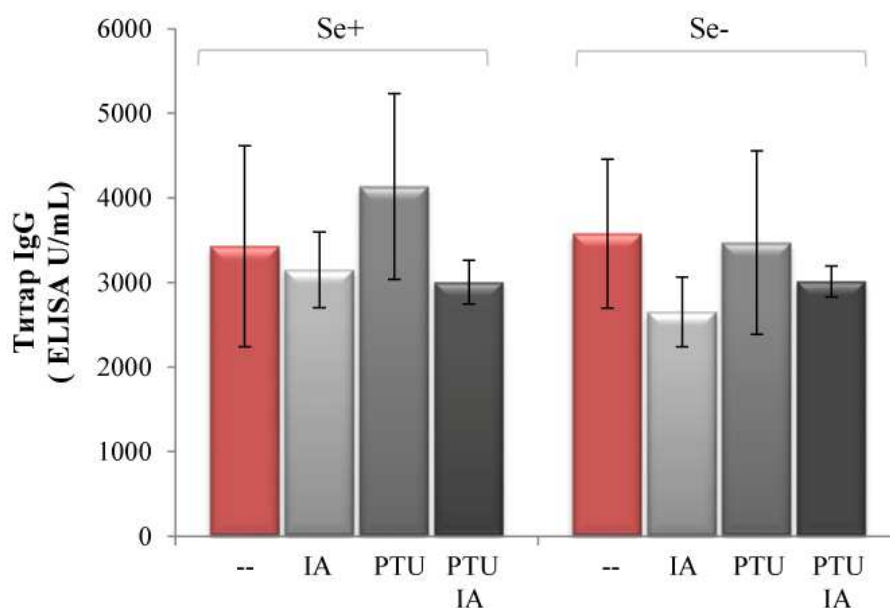
### 5.5.2.2. Испитивање титра IgG реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми пацова након секундарне имунизације суспензијом SRBC

Утврђене вредности титра IgG реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми животиња добијеној из крви узете три дана након секундарне имунизације 10%-ном суспензијом овчијих еритроцита, приказане су у табели 5.5.2.2.1.

**Табела 5.5.2.2.1.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар IgG антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита, у плазми пацова три дана након секундарне имунизације 10%-ном суспензијом овчијих еритроцита. Висина титра је изражена у ELISA U/mL

	група	n	Xsr	SD	SE	Cv (%)	Iv	Med
Se+	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	3427	3367	1190	98	146-9187	2241
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	3148	1181	449	38	844-4808	3285
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	4134	3104	1097	75	2456-11759	3127
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	6	3005	629	257	21	2096-3704	3188
Se-	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	8	3577	2492	881	70	1125-9398	3075
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	7	2651	1092	413	41	212-3278	3084
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	8	3470	3063	1083	88	737-10447	3321
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	7	3013	483	183	16	2090-3704	3086

Титар специфичних IgG у контролној селенадекватној групи износио је  $3427 \pm 3367$  U/mL. Највиши титар ових антитела је забележен у селенадекватној групи третираној пропилтиоурацилом ( $4134 \pm 3104$  U/mL), а најнижи у селенадекватној групи третираној са оба инхибитора дејодиназа ( $3005 \pm 629$  U/mL). Између огледних група није забележена статистички значајна разлика у просечној вредности висине титра IgG реактивних са антигенима овчијих еритроцита (слика 5.5.2.2.1., табела 5.5.2.2.2).



**Слика 5.5.2.2.1.** Утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на титар IgG антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми пацова, три дана након двократне имунизације 10%-ном суспензијом овчијих еритроцита

Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ . (Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе; (\*) статистички значајна разлика у односу на контролну, Se+PTU-IA- групу; (#) статистички значајна разлика међу селендефицитним групама;  $p < 0,05$  у односу на Se-PTU-IA- групу; (§) статистички значајна разлика између селендефицитних и селенадекватних група са истим третманом инхибиторима дејодиназа;  $p < 0,05$

И у овом делу испитивања утицаја примењених третмана на хуморални имунски одговор забележена је велика индивидуална варијабилност у одговору животиња на примењени имуноген. Међутим, изузимање екстремно ниских или високих вредности добијених у појединачним узорцима нема за резултат повећање значајности разлика између посматраних огледних група.

**Табела 5.5.2.2.2.** Статистичка значајност разлика између титара специфичних IgG антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита код пацова, три дана након двократне имунизације 10%-ном суспензијом овчијих еритроцита (Студентов Т-тест, вредност *p*)

		Se+			Se-			
		PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>
<b>Se+</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>	0,8	0,7	0,7	0,9	0,6	1,0	0,7
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>		0,4	0,8	0,7	0,4	0,8	0,8
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>			0,3	0,7	0,2	0,7	0,3
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>+</sup>				0,6	0,5	0,7	1,0
<b>Se-</b>	PTU <sup>-</sup> IA <sup>-</sup>					0,4	0,9	0,5
	PTU <sup>-</sup> IA <sup>+</sup>						0,5	0,4
	PTU <sup>+</sup> IA <sup>-</sup>							0,7

(Se+) селенадекватне групе; (Se-) селендефицитне групе

## 6. ДИСКУСИЈА

На основу праћења биомаркера функционалног статуса селена (активност плазматске GPx3 и GPx1 еритроцита) установљено је да су минималне потребе у селену 0,06 Se/kg хране (плазматска GPx3) односно 0,08mg Se/kg хране (GPx1 еритроцита) (Barnes и сар., 2009), што потврђује да је количина селена у селенадекватним групама у нашем огледу била одговарајућа. Истовремено, јасно је да су селендефицитне групе добијале храну са садржајем селена испод прописаног минимума. Испитивања статуса селена након три и седам недеља нашег огледа показала су да је третман од три недеље био довољан за постизање селендефицитног статуса.

За испитивање утицаја на тиреоидну осовину пацова у нашем раду смо применили третман инхибиторима дејодиназа, јопаноичном киселином (IA) и пропилтиоурацилом (PTU). Јопаноична киселина примарно делује као инхибитор 5` дејодиназа (D1 и D2), при чему је осетљивост ензима D2 на њено инхибиторно деловање већа (St Germain и сар., 1988). У овом раду је примењена доза од 6 mg/100 g t.m. пацова у интервалима од 7 дана, која је обезбедила испољавање њеног очекиваног ефекта на дејодиназу типа 2 (Lanni и сар., 1996; Lanni и сар., 1999). Пропилтиоурацил (PTU) инхибира деловање тиреоидне пероксидазе и последично блокира органификацију јода и тиме синтезу тиреоидних хормона у штитастој жлезди. Такође блокира и периферну конверзију T4 у T3, селективном инхибицијом дејодиназе типа 1. Пропилтиоурацил се користи за индукцију хипотиреозе код еутиреоидних пацова у концентрацијама од 0,01% до 0,1% (Veronikis и сар., 1996). У испитивању утицаја хипотиреоидизма на морфологију и целуларност ткива слезине код јувенилних пацова у огледу Роксандић и сар. (2015) за индукцију хипотиреозе је примењивана значајно нижа доза PTU (1,5 mg/L) од оне коришћене у нашем огледу. Nakamura и сар. (2007) су у циљу испитивања утицаја развојног хипотиреоидизма на функцију имунског система примењивали дозе од 3 ppm и 12 ppm, док Rooney и сар. (2003) примењују PTU у концентрацији од 200 ppm. Klecha и сар. (2006) у испитивању на мишевима примењују дозу од око 6 mg/100 g t.m./дан. У испитивању утицаја дуготрајне

примене PTU (8 и 32 недеље) на одраслим мишевима, Watanabe и сар. (1995) су примењивали PTU у концентрацији 0,1%. Наведени подаци потврђују да се концентрација од 0,015% (150 mg/L) PTU у води за пиће, примењена у нашем огледу, налази у горњем делу опсега доза примењиваних у испитивањима утицаја хипотиреозе на имунски систем код пацова и мишева.

### **6.1. Продукција водоник пероксида код перитонеалних макрофага пацова**

Одређивање нивоа продукције и ослобађања  $H_2O_2$  је општеприхваћена метода за процену функције фагоцитних ћелија (Carreras и сар., 1996; Boveris и сар., 2002). Висококонтролисани механизам продукције реактивних кисеоничних врста (Morel и сар., 1991), значајан је за бројне ћелијске процесе неопходне за оптимално функционисање урођеног и стеченог имунског одговора: микробицидно деловање, унутарћелијску сигнализацију значајну за активацију и диференцијацију ћелија, као и међућелијску комуникацију (Adler и сар., 1999; Forman и Torres, 2001; Huang и сар., 2012; McCord, 2000).

Наш оглед је изведен на перитонеалним макрофагима пацова, ћелијама које стварају значајне количине водоник пероксида у одговору на различите стимулусе (Nathan и Root, 1977). У циљу повећања приноса перитонеалних ћелија, код пацова је изазивана стерилна инфламација интраперитонеалном апликацијом тиогликолатног медијума (Eichner и Smeaton, 1983; Melnicoff и сар., 1989; Stanojević и сар., 2007). Седам дана касније, када се очекује да већину ћелија у перитонеуму чине макрофаги (Segura и сар., 1996; Stanojević и сар., 2016) спроведена је њихова жетва перитонеалном лаважом. Продукција  $H_2O_2$  је стимулирана након адхезије макрофага за пластику, додавањем форбол-миристат-ацетата (PMA) који активира протеин киназу C (PKC) што у макрофагима резултује и респираторним праском (Pick и Keisari, 1981; Robinson и сар., 1985).

Просечна количина ослобођеног водоник пероксида у контролној селенадекватној групи пацова (Se+PTU-IA-) након три недеље нашег огледа износила је  $4,0 \pm 2,2 \mu M / 2,5 \times 10^5$  ћелија. Због различитог начина исказивања нивоа продукције водоник пероксида код макрофага, односно због разлика у

дизајну огледа у погледу коришћене популације макрофага, животињске врсте од којих потичу, начина њихове индукције/активације и стимулације респираторног праска, као и методе одређивања  $H_2O_2$  које су коришћене у студијама других истраживачких група, нисмо били у могућности да директно упоредимо квантитативне резултате наше контролне групе са резултатима других аутора.

У свим селендефицичним групама је, независно од примене инхибитора дејодиназа, продукција водоник пероксида била вишеструко смањена у односу на селенадекватну контролну групу (Se+PTU-IA-) и није било значајне разлике између селендефицичних група третираних инхибиторима и нетретиране групе (Se-PTU-IA-).

Редукован ниво  $H_2O_2$  може бити последица 1) смањених капацитета ћелије за продукцију  $H_2O_2$ ; 2) појачаног уклањања  $H_2O_2$  деловањем антиоксидативних система ћелије, пре свега каталазе и глутатион пероксидазе, или 3) њиховог комбинованог деловања.

Полазну реакцију у стварању ROS макрофага катализује ензимски комплекс NADPH оксидазе, користећи NADPH као донор електрона (Rossi и Zatti, 1964; Babior, 1999). У овој реакцији настаје нестабилни супероксидни анјон ( $O_2^-$ ) од ког спонтано или деловањем ензима супероксид-дисмутазе настаје водоник пероксид ( $H_2O_2$ ). Сматра се да дефицит селена сам по себи не доводи до смањења активности супероксид дисмутазе (Serfass и Ganther, 1976; Oh и сар., 1982). Кључну улогу у уклањању водоник пероксида у фагоцитима има глутатион пероксидаза (Spletstoesser и Schuff-Werner, 2002; Roos и сар., 1980; Baker и Cohen, 1983). Овај ензим се налази ниско у хијерархији селенопротеина, те је очекивано да је у условима дефицита селена њена активност смањена, што је потврђено и у нашем раду. Иако у нашем огледу није директно испитиван ниво GPx у перитонеалним макрофагима, Serfass и Ganther (1976) наводе да је селендефицична исхрана (<0,01 ppm) у периоду од 5 недеља довела до значајног смањења активности GPx перитонеалних макрофага пацова у односу на вредности забележене у селенадекватним групама. Према истим ауторима, активност GPx фагоцитних ћелија је код пацова са селенадекватном исхраном (0,5 ppm) виша него у другим ткивима

(двоструко виша него у еритроцитима), док у селендефицитним условима смањење активности фагоцитне GPx настаје брже него смањење активности GPx еритроцита али постепеније него пад активности GPx јетре, како је забележено у раду Hafeman и сар. (1974). Имајући у виду улогу GPx у уклањању насталог водоник пероксида, очекивали смо да би њена смањена активност за последицу могла да има спорије уклањање и тиме виши ниво водоник пероксида у селендефицитним у односу на селенадекватне групе. На овакав могући механизам дејства дефицита селена на продукцију пероксида указали су налази Spallholz и Boylan (1989), према којима је стимулација фагоцитозе селендефицитних резидентних макрофага зимосаном резултирала повећаном продукцијом  $H_2O_2$  у односу на селенадекватне ћелије. И Oh и сар. (1982) бележе већу активност глутатион пероксидазе и последично смањену продукцију водоник пероксида у перитонеалним макрофагима селенадекватних пацова односу на селендефицитне јединке, мерену током фагоцитозе.

Насупрот очекивању, у нашим експерименталним условима ниво  $H_2O_2$  је био вишеструко мањи код селендефицитних перитонеалних макрофага него у условима адекватног снабдевања селеном. Негативан утицај дефицита селена на ниво продукције супероксидног анјона након стимулације са РМА, потврђен је у испитивању Safir и сар. (2003) спроведеном на J774A.1 ћелијској линији мишијих макрофага *in vitro*. Parnham и сар. (1983) описују да су селендефицитни резидентни перитонеални макрофаги пацова стимулирани форбол-миристетат-ацетатом (РМА) стварали значајно мање  $H_2O_2$  од контролних селенадекватних ћелија, након 12 недеља селендефицитне исхране, што је у складу са резултатима добијеним у нашем огледу. Податак да је у истом раду при стимулацији фагоцитозе макрофага применом опсонизованог зимосана забележено стварање веће количине водоник пероксида код селендефицитних него селенадекватних макрофага, потврђује и да начин стимулације ових ћелија значајно утиче на резултате огледа.

Слична запажања постоје и код других врста фагоцитних ћелија. Baker и Cohen (1983) наводе да гранулоцити селендефицитних пацова не могу адекватно да метаболишу  $H_2O_2$ , што резултира разарањем система за продукцију  $O_2^-$  (NADPH оксидазе), услед нагомилавања  $H_2O_2$  у ћелији.



Испитивање продукције ROS код ових гранулоцита у зависности од времена показало је да је продукција  $O_2^-$ , стимулисана применом РМА, у селендефицичним ћелијама иницијално иста као код селенадекватних ћелија, док продужена стимулација (преко 20 минута) за последицу има смањену продукцију ROS. Претпостављено је да је оштећење мембранских структура и ензима кључних за продукцију ROS, изазвано нагомилавањем пероксида, довело до прераног завршетка респираторног праска код селендефицичних ћелија. Иако је респираторни прасак код неутрофила израженији него код макрофага, описани механизам би могао бити објашњење за смањену продукцију  $H_2O_2$  код макрофага у селендефицичним групама у нашем огледу. Додатна потврда за овакав сценарио се добија уколико се анализира ефекат примењеног стимулатора на испитиване ћелије. Насупрот физиолошким стимулусима респираторног праска (нпр. фагоцитоза) који постепено активирају мембрански везану NADPH оксидазу, РМА покреће снажан и нагли респираторни прасак директном активацијом протеин киназе РКС (Spletstoeser и Schuff-Werner, 2002). Испитивање активације макрофага и нивоа ћелијских антиоксиданаса након примене РМА показало је да ово једињење, мада у вишој концентрацији од оне примењене у нашем огледу, узрокује пероксидацију ћелијских липида код перитонеалних макрофага селенадекватних мишева, при чему је максимални ефекат постигнут након једног сата инкубације ћелија (Carter и сар., 1996). Забележена пероксидација је била повезана са смањењем активности ћелијских антиоксидативних система и огледала се у смањеном нивоу укупног глутатиона и смањењу нивоа каталазе код РМА-стимулисаних у односу на нестимулисане ћелије. И Parnham и сар. (1983) смањену продукцију водоник пероксида код селендефицичних резидентних перитонеалних макрофага објашњавају поремећајем интрацелуларне организације органела услед стварања великих вакуола у ћелији након примене РМА, што уз истовремено смањену активност антиоксидативних капацитета ћелије доводи до њеног оштећења и смањене продукције  $H_2O_2$ . Имајући у виду да су у нашем огледу коришћене ћелије добијене применом тиогликолата, које карактерише присуство великих цитоплазматских вакуола (Cook и сар., 2003), као и измењене метаболичке

карактеристике и већи капацитет за респираторни прасак у односу на резидентне макрофаге, описани ефекат РМА би у селендефицирним, прооксидативним условима нашег огледа додатно могао допринети оштећењу ћелијске функције, у смислу капацитета за дуготрајну продукцију ROS.

Примена инхибитора дејодиназа није имала значајан утицај на просечну продукцију водоник пероксида, па унутар група са истим статусом селена нису уочене статистички значајне разлике, нити разлике у односу на одговарајућу нетретирану групу (Se+PTU-IA- групу, односно Se-PTU-IA- групу). Доступни радови у којима је испитиван утицај тиреоидног статуса на активност перитонеалних макрофага пацова дају контрадикторне закључке, могуће због различитог типа и статуса испитиваних ћелија (резидентне, инфламаторне или ћелије активирани антигеном) и начина њихове стимулације. Тако су у складу са нашим резултатима резултати огледа Costa Rosa и сар. (1995) изведеног на хипотиреоидним - тиреоидектомисаним селенадекватним пацовима. Продукција водоник пероксида (са и без стимулације применом РМА) је код инфламаторних, тиогликолатом индукованих перитонеалних макрофага пореклом од пацова са хипотиреозом у овом огледу била нешто виша, али се није значајно разликовала од еутиреоидне контроле.

Резултати нашег огледа указују на доминантан утицај количине селена у исхрани пацова, а не тиреоидног статуса, на продукцију пероксида перитонеалних макрофага. Изостанак утицаја измењеног тиреоидног статуса потврђује и следеће: између група са истим третманом инхибиторима дејодиназа и различитим статусом селена забележена је статистички значајна разлика у продукцији водоник пероксида; при томе нису забележене ни статистички значајне разлике у нивоу Т3 и Т4 у плазми (табела 5.1.1.), иако тиме нису искључене потенцијалне разлике у локалном/интрацелуларном нивоу тиреоидних хормона на које је можда утицао статус селена.

Сматрамо да би се регистрована смањена синтеза пероксида, тј. смањен оксидативни прасак перитонеалних макрофага могао тумачити и као адаптивни механизам који се активира у циљу спречавања оштећења ћелија које би било изазвано високом продукцијом ROS у условима смањене расположивости антиоксидативних ензима. Који је од ових предложених механизма одговоран

за примећени феномен остаје да буде испитано у наредним истраживањима. Без обзира на механизам који лежи у основи забележених промена, добијени резултати недвосмислено упућују на закључак који је у складу са закључцима Huang и сар. (2012), да је за развој оптималног оксидативног праска и продукцију ROS неопходно адекватно снабдевање селеном. Како су реактивне кисеоничне врсте, посебно  $H_2O_2$ , значајне не само са аспекта микробицидног деловања већ и као секундарни гласници у модулацији физиолошких одговора макрофага и комуникацији са околним ћелијама, њихова смањена продукција би за последицу могла имати измењен имунски одговор.

## **6.2. Адхеренца перитонеалних макрофага пацова**

Капацитет макрофага за адхезију на пластику (полистирен) рефлектује њихов функционални статус, тј. степен активације *in vivo* (Oez и сар., 1990). У нашем испитивању су коришћени перитонеални макрофаги пацова активирани тиогликолатним медијумом. Способност перитонеалних макрофага да адхерирају за пластику је испитивана након њихове инкубације у периоду од 10, 30 и 60 минута. Резултати нашег огледа показују да је ниво спонтане адхеренце перитонеалних макрофага у контролној Se+PTU-IA- групи био уједначен у свим терминима испитивања, са незнатним повећањем вредности OD<sub>620</sub> након 30 минута и без даље промене вредности.

У селенадекватним условима, појединачна и истовремена примена инхибитора дејодиназа и евидентна системска хипотиреоза забележена у групама третираним пропилтиоурацилом нису значајно утицали на способност адхеренце перитонеалних макрофага. Иако је у селенадекватним групама које су биле третиране пропилтиоурацилом или јопаноичном киселином (Se+PTU+IA- и Se+PTU-IA+) са продужењем периода инкубације уочено статистички значајно повећање адхезије, ове групе се ни у једном термину испитивања нису разликовале од контролне групе (Se+PTU-IA-).

Сматрамо да је изостанак ефекта третмана инхибиторима дејодиназа на адхезију макрофага селенадекватних пацова био у складу са резултатима Canning и сар. (2001), који су показали да су код аутоимунних болести

тиреоидне жлезде, праћених или хипо- или хипертиреозом, измењене функције моноцита посредоване интегринима и хемокинима последица аутоимуног статуса, а не измењеног нивоа тиреоидних хормона. Изостанак утицаја хипотиреозе на способност адхеренце неутрофила пореклом од хуманих пацијената описују Palmblad и сар. (1981). Такође, хипотиреоза узрокована тиреоидектомијом у огледу Costa Rosa и сар. (1995) није имала утицај на миграцију периферних моноцита у перитонеалну дупљу након примене тиогликолата, мада капацитет за адхезију није директно испитиван.

Међутим, сам дефицит селена је у нашем огледу резултирао значајном стимулацијом адхеренце перитонеалних макрофага која је била уочљива већ након 10 минута инкубације ћелија, са најизраженијим ефектом забележеним након 60 минута, када је адхеренца у Se-PTU-IA- групи била скоро двоструко већа него у контролној Se+PTU-IA-групи.

Процес *in vitro* адхезије ћелија се састоји из три фазе: везивање ћелије за супстрат/пластику, измена облика ћелије у циљу повећања површине контакта, и организација актина са формирањем фокалних адхезија између ћелије и супстрата (Khalili и Ahmad, 2015). Површински молекули који су укључени у почетно слабо везивање ћелија су селектини, а затим је чвршће везивање посредовано  $\beta$  интегринима. У процес адхезије су укључени комплексни механизми који обухватају регулацију експресије и афинитета интегрина, њихове конформационе промене и разматавања интегринских ланаца, просторно раздвајање и регулацију авидитета интегрина, односно јачине адхеренце (Imhof и Aurrand-Lions, 2004). Повећана адхеренца перитонеалних макрофага забележена у Se-PTU-IA- групи би могла бити резултат утицаја дефицита селена на неки од наведених механизма.

У развоју инфламације централну улогу има нуклеарни фактор NF- $\kappa$ B који је, између осталог, остварује и кроз позитивну регулацију гена за синтезу адхезивних молекула (Sprague и Khalil, 2009). Како селен инхибира NF- $\kappa$ B каскаду (Duntas, 2009), могло би се очекивати да се смањена инхибиција у условима његовог дефицита рефлектује и кроз повећану експресију адхезивних молекула. Други механизам којим би се можда могао објаснити наш резултат је утицај селена на експресију ензима циклооксигеназе 2 (Cox-2).

На ћелијској линији RAW264.7 је показано да дефицит селена стимулише експресију ензима Cox-2, и то кроз активацију NF-κB која је индукована оксидативним стресом (Zamamiri-Davis и сар., 2002). Надокнада селена код селендефицитних макрофага инхибира експресију проинфламаторних гена индуковану применом LPS, какав је ген за Cox-2 (Vunta и сар., 2008). Изостанак експресије овог ензима код Cox-2<sup>-/-</sup> мишева или његова селективна инхибиција код Cox-2<sup>+/+</sup> јединки резултирају редукованим капацитетом перитонеалних макрофага за адхезију (Diaz-Munoz и сар., 2013). Оксидативни стрес је и у испитивањима на другим врстама ћелија повезиван са стимулативним дејством на експресију адхезивних молекула (Roebuck и Finnegan 1999; Burek и Rose, 2008). Ahrens и сар. (2008) су показали да селен стимулише активност матриксних металопротеиназа (ММР), ензима који учествују у протеолизи L-селектина моноцита. Надокнада селена је узроковала уклањање L-селектина и смањено котрљање моноцита са последичним смањењем адхезије ових ћелија за ендотел капилара. Већа адхеренца забележена у Se-PTU-IA- групи у нашем огледу би могла да се објасни улогом селена у активности ММР укључених у протеолизу интегринских молекула на површини макрофага *in vivo*.

Смањена адхеренца може да буде показатељ повећане способности макрофага да напусте локално микроокружење, односно појачана адхеренца може указивати на мањи капацитет ћелија за миграцију. Стерилни перитонитис изазван применом тиогликолата карактеришу динамичке промене фенотипа и функционалних карактеристика перитонеалних ћелија. Интраперитонеална примена тиогликолата узрокује излазак скоро свих резидентних перитонеалних макрофага миша у року од 4 сата и њихову миграцију у регионалне лимфне чворове (Gomez и сар., 2012). Након изласка резидентних перитонеалних макрофага, долази до инфилтрације инфламаторних моноцита из периферне крви и њихов ниво достиже максимум 3-4 дана након инјекције тиогликолата, након чега ове ћелије полако напуштају перитонеалну дупљу и током наредних 4-14 дана одлазе до оментума и регионалних лимфних чворова (Bellingan и сар., 1996; Gomez и сар., 2012). Док је за развој инфламаторне реакције кључан прилив моноцита/макрофага на место инфламације, за ограничење и

резолуцију локалног инфламаторног процеса је неопходно да га макрофаги напусте. Интегрин  $\beta 2$  је адхезивни молекул са улогом у уласку леукоцита на место инфламације. Gomez и сар. (2012) су на моделу инфламаторног перитонитиса код миша, индукованог применом тиогликолата, показали да код макрофага овај интегрин има и улогу у напуштању места инфламације. Протеолиза ектодомена  $\beta 2$  интегрин перитонеалних макрофага која је посредована металопротеиназама, доприносила је напуштању перитонеалне дупље у фази резолуције инфламације. При томе је ниво солубилног интегрин  $\beta 2$  ( $s\beta 2$ ) у перитонеуму био највиши управо у време максималног ефлукса инфламаторних ћелија. Како су у нашем огледу испитиване ћелије добијене 7 дана након инфламације тј. у периоду када је вероватно започела и резолуција инфламаторног процеса, не можемо са сигурношћу да знамо да ли је повећан ниво адхеренце макрофага у Se-PTU-IA- групи резултат проинфламаторног дејства дефицита селена или овај дефицит може да има и антиинфламаторно дејство. С обзиром да су и улазак моноцита током инфламације као и излазак макрофага током резолуције инфламације посредовани  $\beta 2$  интегринима, временски зависан утицај селена на његову експресију и њиме посредовану миграцију макрофага остаје да буде утврђен у наредним испитивањима.

Са друге стране, Selvarajan и сар. (2011) наводе да адхезија макрофага индукује активацију гена укључених у одржавање редокс хомеостазе. С обзиром на то да у било којој реакцији инфламације адхезија циркулишућих моноцита на ендотел предходи њиховој активацији и синтези ROS, повишен ниво адхеренце може бити механизам савладавања појачаног оксидативног стреса који се развија у инфламацији, а који је израженији у селендефицитним условима нашег огледа у којима је регистрована и смањена продукција пероксида.

Интересантно је да је у свим селендефицитним групама у којима су примењивани инхибитори дејодиназа, ниво адхеренце макрофага након 60 минута инкубације био значајно нижи него у селендефицитној нетретираној (Se-PTU-IA-) групи. При томе је системска хипотиреоза потврђена у групама третираним пропилтиоурацилом (Se-PTU+IA- и Se-PTU+IA+), док се ниво тиреоидних хормона у системској циркулацији у групи третираној

јопаноичном киселином није разликовао од контроле. Међутим, могуће је да је на нивоу макрофага и у групи третираној само јопаноичном киселином ниво Т3 био измењен што је утицало на функцију ових ћелија у условима изазваним дефицитом селена. Наиме, Wittmann и сар. (2014), Ma и сар. (2011), Varca-Mayo и сар. (2011) су показали да инфламација индукује експресију дејодиназе типа 2 у ћелијама у којима је у условима мировања експресија овог ензима минимална или је нема, што указује на значај локално насталог Т3 у инфламаторном одговору. Наведене групе истраживача сматрају да активација D2, односно локално створени Т3 има антиинфламаторну улогу. Kwakkel и сар. (2014) наводе да је у инфламаторном одговору макрофага поред системског нивоа тиреоидних хормона важан и њихов интрацелуларни ниво, уз претпоставку да у инфламацији постоји повећана потреба за тиреоидним хормонима на нивоу ћелије значајна за њихове функције, какав је капацитет за фагоцитозу. Ова група аутора описује стимулацију експресије тиреоидних рецептора (TR $\alpha$ ), транспортера MCT10 и експресију дејодиназе типа 2 у Купферовим ћелијама код мишева током акутне и хроничне инфламације и доводе у питање њену зависност од системског нивоа Т3. И Wittmann и сар. (2014) наводе могућност да су макрофаги циљне ћелије за Т3 који настаје локално у фибробластима лептоменинги током инфламације, а као могући пут активације D2 наводе индукцију NF- $\kappa$ B. Иако присуство D2 у перитонеалним макрофагима није испитивано, инхибиција овог индуцибилног ензима применом јопаноичне киселине, уз његову истовремено смањену експресију услед дефицита селена би за последицу могла имати редукован ниво Т3 на нивоу макрофага.

Анализу резултата додатно компликује чињеница да је код макрофага укључених у инфламаторни процес могућа и експресија ензима D3, при чему је она установљена и код M1 (проинфламаторног) и M2 (имуномодулаторног) фенотипа ћелија што указује на улогу овог ензима у различитим патофизиолошким механизмима (Voelen и сар., 2009). При томе, познато је да активацијом макрофага настаје спектар субпопулација ових ћелија које се по својим фенотипским карактеристикама налазе између M1 и M2 екстрема. Даље, показано је да у перитонеалној дупљи мишева постоје две доминантне

субпопулације макрофага, LPM и SPM, које се разликују по понашању током инфламације (Ghosh, 2010). Дефицит селена се повезује са промоцијом проинфламаторног (M1) фенотипа, а ниво Т3 може да утиче на M1/M2 поларизацију, као и на однос LPM и SPM и у мировању и након развоја инфламације (Perrotta и сар., 2014), односно на кинетику инфламаторног процеса и динамичке измене односа присутних субпопулација ових ћелија. Познато је да карактеристике макрофага зависе од активационих сигнала и сигнала које примају из микроокружења (Stout и Suttles, 2004). Стога је могуће да је различит локални хормонски и укупни сигнални миље у овим групама имао за последицу заступљеност различитих субпопулација перитонеалних макрофага, што се манифестовало и кроз њихове различите капацитете за адхеренцу.

Према нашим резултатима, ниво тиреоидних хормона у циркулацији није корелирао са капацитетима макрофага за адхеренцу, што указује да 1) системски тиреоидни статус не утиче на капацитете макрофага за адхеренцу, бар у условима адекватног снабдевања селеном; 2) постоји локална контрола концентрације активног хормона на нивоу ћелије, или најмање на нивоу локалног окружења. У условима адекватног снабдевања селеном хомеостатски механизми су омогућили да се, без обзира на примењене третмане и уочене разлике у системском нивоу Т3, огледне групе не разликују. Са друге стране, дефицит селена је значајно стимулисао адхеренцу макрофага, а индукована хипотиреоза је овај ефекат селена супримирао, кроз још увек недовољно познате механизме.

Прецизније објашњење за добијене резултате би се могло добити испитивањем могућности индуцибилне експресије дејодиназе D2 и/или D3 на нивоу ове популације макрофага, као и расположивости тиреоидних хормона на нивоу ћелије. Увид у механизме који су довели до уочених разлика између група омогућила би и додатна испитивања фенотипских карактеристика субпопулација перитонеалних макрофага и њиховог међусобног односа у перитонеуму, као и кинетике промена на нивоу ћелијских субпопулација у зависности од времена, а на које су могли утицати сви примењени третмани.



Када су посматране промене на нивоу исте огледне групе током времена, код селенадекватних пацова уочено је значајно повећање адхезије у групама третираним појединачним инхибиторима дејодиназа, док у групи третираној комбинацијом инхибитора и у нетретираној групи овај ефекат није запажен. Овакво понашање се поклапа са резултатима забележеним у селендефицитним групама, где је адхезија макрофага у Se-PTU+IA+ групи такође пратила модел адхезије макрофага у селендефицитној нетретираној групи (Se-PTU-IA-), иако је забележени ниво адхеренце након 60 минута у групи третираној са оба инхибитора био нижи. Могуће објашњење за овакав резултат би било да је примена оба инхибитора довела до измене у локалном нивоу хормона (на нивоу макрофага) у смеру повећања расположивог T3.

С обзиром на то да није познато да би истовремено давање јопаноичне киселине и пропилтиоурацила могло да потре њихов инхибиторни ефекат, овај феномен би се могао објаснити укључивањем других биохемијских механизма и путева који учествују у метаболизму тиреоидних хормона. Код селендефицитних пацова су повећане количине T3 сулфата у циркулацији и повећана његова ентерохепатична рецикулација (Chanoine и сар., 1992), односно коњугација T3 са сулфатом у неким ситуацијама може да обезбеди већу расположивост активног тиреоидног хормона (Peeters и Visser, 2017). Постоје подаци који показују да се у присуству јопаноичне киселине и/или пропилтиоурацила повећано генерише T3 сулфат јер је спречена његова разградња под утицајем D1. У условима хипотиреозе, T3 сулфат представља резервоар неактивног хормона (Peeters и Visser, 2017) од ког деловањем тивних сулфатаза може настати активни T3 (Visser, 1996; Wu и сар., 2005; Visser, 1994). Познато је да макрофаги садрже значајну количину сулфатаза (Serhan и сар., 2010), те се овај механизам генерисања T3 у условима хипотиреозе и инхибиције активности дејодиназа чини могућ, али његово постојање остаје да буде потврђено у наредним студијама.

### 6.3. Целуларност слезина пацова

Одређивање броја ћелија у тимусу, слезини, костној сржи и периферним лимфним чворовима се користи као метода за утврђивање потенцијалних промена на нивоу имунског система, због тога што измена у броју ћелија у овим органима и ткивима указује на имуномодулационо дејство испитиваног третмана. У нашем огледу испитиван је утицај дефицита селена и инхибитора дејодиназа на укупну целуларност тј. апсолутни број леукоцита у слезинама. Слезине су узорковане од пацова старих 10 недеља, који су у огледу били укупно 7 недеља и који су двократно у интервалу од 15 дана имунизовани суспензијом овчијих еритроцита (енг. SRBC).

Анализом података о целуларности слезина и телесној маси јединки утврђена је значајна корелација између ова два параметра. Иако нисмо испитивали укупну масу овог органа, такав налаз указује да су промене на нивоу слезине вероватно следиле тренд промена на нивоу читавог организма. Међутим, испитивањем појединачних популација леукоцита установљено је да је између њих постојао различит ниво осетљивости на испитиване третмане, што је детаљно описано у посебним поглављима ове дисертације.

Просечан број укупних леукоцита у слезинама пацова у контролној селенадекватној групи (Se+PTU-IA-) у нашем огледу био је  $566 \pm 227 \times 10^6$ , што је било у оквиру вредности које смо и раније добијали у нашим лабораторијама (*непубликовани подаци Института за медицинска истраживања*).

Код свих група пацова са селендефицитном исхраном је и након седам недеља нашег огледа потврђена ниска концентрација селена у пуној крви и ниска активност ензима глутатион пероксидазе. Дефицит селена и селенопротеина се повезују са смањењем целуларности лимфатичног ткива. Иако не директно упоредива са нашим огледом, испитивања Shrimali и сар. (2008) и Carlson и сар. (2010) описују да је потпуно искључење гена кључног за синтезу селенопротеина (Sec tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>) у Т ћелијама мишева за резултат имало смањење целуларности и масе лимфатичног ткива код мишева, укључујући и слезину, на 50-80% од контролних вредности. Peng и сар. (2012) наводе да је селендефицитна исхрана (0,034 mg/kg хране) током 6 недеља

почевши од првог дана старости, код бројлера резултирала смањењем апсолутне и релативне масе слезине, са хистолошки потврђеном деплецијом лимфоцита и повећаним процентом спленоцита у апоптози, заустављеним ћелијским циклусом и повећаним оксидативним стресом.

Целуларност слезине пацова селендефицидне групе нетретиране инхибиторима дејодиназа (Se-PTU-IA-) у нашем огледу није била значајно различита од целуларности слезине селенадекватне контролне (Se+PTU-IA-) групе. Smith и сар. (2011) такође нису установили да је селендефицитна исхрана у трајању од 7-8 недеља значајно утицала на целуларност слезине код мишева (старих три недеље на почетку огледа), иако је била праћена смањењем активности GPx јетре за више од 99%. Овај налаз је објашњен чињеницом да измењене вредности нивоа селена у крви и активности GPx не морају нужно да одражавају ниво селена у лимфатичним органима, тј. да је могуће да период селендефицидне исхране није био довољно дуг да доведе до израженијег пражњења селена на нивоу укупних ћелијских популација слезине. Слична претпоставка се може поставити и у нашем огледу, јер литературни подаци указују на одређени ниво приоритета у снабдевању имунског система или његових појединих делова селеном, у односу на друга ткива (Reilly, 2013). Raunter (1979) наводи да је након примене селена активност глутатион пероксидазе у слезини и лимфним чворовима оваца виша него у осталим ткивима (осим у крви), као и да у условима дефицита селена у овом ткиву активност GPx опада спорије него у крви. Ueno и сар. (2008) такође указују на преференцијално снабдевање слезине селеном у условима његовог дефицита. Behne и Höfer-Bosse (1984) наводе да је примена инјекција селенита код селендефицичних пацова резултирала приоритетним снабдевањем слезине и тимуса селеном, тј. да су ови органи преузели количину селена која није била пропорционална њиховој маси. У складу са наведеним, у нашем огледу ниво дефицита селена на нивоу слезине вероватно није био толико изражен или није трајао довољно дуго да би смањење укупног броја леукоцита у слезини било на нивоу статистичке значајности, иако су се појединачне популације леукоцита показале осетљивијим у односу на друге.

Са друге стране, примена пропилтиоурацила (самостално у Se+PTU+IA- групи, или у комбинацији са јопаноичном киселином у Se+PTU+IA+ групи) је довела до статистички значајног смањења апсолутног броја леукоцита у слезинама пацова у односу на контролну Se+PTU-IA-групу. Смањење целуларности је било израженије када је истовремено био присутан и дефицит селена, па су се Se-PTU+IA- и Se-PTU+IA+ група значајно разликовале од селенадекватне контроле (Se+PTU-IA-), али и од селендефицитне нетретиране групе (Se-PTU-IA-) и од свог одговарајућег селенадекватног пара.

Анализа тиреоидног статуса показује да је примена пропилтиоурацила у свим групама индуковала развој системске хипотиреозе, која је потврђена анализом нивоа тиреоидних хормона и TSH у плазми након три и седам недеља огледа. Карактеристично је да је након седам недеља третмана у групама третираним са PTU и даље бележена снижена концентрација тироксина (T4) и повишена концентрација TSH у плазми у односу на контролну групу, док је вредност концентрације тријодтиронина (T3) у плазми у овом термину била релативно уједначена, са изузетком Se-PTU+IA- групе. Милановић (2012) у својој докторској дисертацији овај феномен објашњава успостављањем хомеостатских механизма који омогућавају (иако највероватније само краткотрајну) регулацију нивоа T3 у условима када је хипотиреоза индукована блокаторима дејодиназа.

Да хипотиреоидизам индукован тиреидектомијом смањује масу и целуларност слезине одраслих пацова показали су различити истраживачи (Fabris, 1973; Vandyug и сар., 2003). Промене у маси и целуларности лимфатичних органа су утврђене и када је хипотиреоза индукована применом PTU. За разлику од нашег огледа у којем је PTU даван и његов ефекат испитиван на јувенилним животињама, циљ већине доступних испитивања је био утврђивање утицаја хипотиреозе, изазване применом PTU женкама током гестације или у периоду лактације, на развој имунског система код потомства (Nakamura и сар., 2007; Rooney и сар., 2003; Роксандић и сар., 2015). При упоређивању резултата ових радова и резултата нашег огледа треба узети у обзир да старост животиња и ниво матурације имунског система могу да утичу на резултате испитивања. Имуномодулациони ефекти су вероватно израженији

када су животиње изложене третману током пре- или перинаталног периода него када су испитивања спроведена на јединкама са већ развијеним имунским системом. Ипак, тип и смер промена који су забележени у овим испитивањима у сагласности су са резултатима нашег огледа. Индиректан имуносупресивни ефекат антитиреоидних лекова, настао као последица њиховог деловања на ниво тиреоидних хормона, потврђују испитивања у којима је утицај PTU на популације ћелија слезине био спречен истовременом применом са T3 (Pacini и сар., 1983; Klecha и сар., 2006).

Након седам недеља огледа, деловањем хомеостатских механизма дошло је до релативног изједначавања нивоа T3 у плазми између селенадекватних група, након првобитно забележеног значајног смањења (након 3 недеље), иако су установљени нивои T4 и TSH и даље потврђивали хипотиреоидни статус. Познато је да ниво T3 у ткивима зависи од његовог нивоа у плазми и од активности дејодиназа које врше локалну конверзију T4 у T3, у ткивима која их експримирају. Она ткива која не експримирају дејодиназе практично зависе од концентрације T3 у плазми (Escobar-Morreale и сар., 1995). Међутим, могуће је да период нормализације нивоа T3 у плазми кратко трајао и није био довољан да би омогућио обнављање целуларности слезине. Поред тога, присутну системску хипотиреозу су и даље потврђивале вредности TSH и T4. Исто објашњење се може применити и на селендефицитну групу третирану пропиолтиоурацилом у комбинацији са јопаноичном киселином (Se-PTU+IA+), док је у групи третираној само са PTU (Se-PTU+IA-) и даље бележен низак ниво циркулаторног T3.

Обе наведене селендефицитне групе је карактерисао је већи степен смањења целуларности слезина него њихов селенадекватни пар. Овакви резултати могли би бити последица кумулативног ефекта дефицита селена и дефицита тиреоидних хормона и сматрамо да је дефицит селена, преко утицаја на ниво тиреоидних хормона, потенцирао ефекат инхибитора дејодиназа на смањење целуларности слезине.

Самостална примена јопаноичне киселине није узроковала статистички значајну промену укупне целуларности слезине у Se+PTU-IA+ и Se-PTU-IA+ групи у односу на контролну групу, што се могло и очекивати јер у овим

групама није забележена системска хипотиреоза ни у једном термину одређивања параметара тиреоидног статуса.

#### **6.4. Б лимфоцити**

Популација Б лимфоцита се од осталих леукоцита слезине пацова разликује по експресији CD45 изоформи јединственој за Б ћелије, CD45RA (Suckow, 2005). Овај површински маркер је уз негативни маркер CD3 коришћен за диференцијацију Б лимфоцита у нашем огледу. Добијени резултати показују да су, у односу на посматране популације ћелија слезине, примењени третмани имали најизраженији модулативни утицај на популацију Б лимфоцита.

Просечна релативна заступљеност популације Б лимфоцита (CD3<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) у слезинама пацова контролне (Se+PTU-IA-) групе након седам недеља огледа износила је  $10,1 \pm 5,2\%$  у односу на укупну популацију леукоцита слезине. Селендефицитна исхрана у трајању од 7 недеља имала је инхибициони ефекат на ову популацију ћелија, па је у Se-PTU-IA- групи проценат Б лимфоцита био за 63% мањи него у селенадекватној контролној групи, што је било праћено и смањењем апсолутног броја ових ћелија. Литературни подаци који описују утицај нутритивног дефицита овог олигоелемента на Б лимфоците су генерално оскудни. Vega и сар. (2007) наводе да је исхрана дефицитна у селену ( $0,02 \text{ ppm}$  у облику селенометионина) током 50 дана довела до смањења процентуалне заступљености Б лимфоцита (C19<sup>+</sup>) у слезинама одраслих мишева за око 50% у односу на контролу ( $0,2 \text{ ppm}$ ), што је у складу са нашим резултатима. Познато је да селенопротеини имају важну улогу у контроли редокс статуса и редокс сигнализације у ћелијама имунског система (Huang и сар., 2012). Према Yang и сар. (2016), дефицит селена у примарним и секундарним органима имунског система бројлера утицао је највише на експресију антиоксидативних селенопротеина, пре свега глутатион пероксидаза и тиоредоксин редуктаза. Стога је могуће да су евидентни дефицит селена, а тиме и селенопротеина на нивоу секундарних и примарних органа лимфатичног система, имали за последицу виши ниво оксидативног стреса са различитим ефектима на различите популације ћелија. Повишен ниво

интрацелуларних ROS и измењена ћелијска редокс сигнализација су тако могли утицати на диференцијацију и пролиферацију Б ћелија и довести до смањења њиховог релативног и апсолутног броја у слезини. Већу осетљивост Б ћелија у односу на остале популације потврђују Marsh и сар. (1986) који су испитивали утицај дефицита селена на примарним лимфатичним органима и установили да дефицит селена инхибира развој *B. fabricii* код пилића, док на тимус утиче тек уз истовремени дефицит витамина Е.

Наше испитивање је спроведено на слезинама пацова који су двократно имунизовани суспензијом овчијих еритроцита. Иако у физиолошким условима унутарћелијска продукција ROS након излагања антигену и стимулације Б ћелијског рецептора (BCR) стимулише даљу активацију и пролиферацију Б ћелија (Wheeler и DeFranco, 2012), могуће је да би повишен ниво ROS пре стимулације, узрокован дефицитом селена, могао да ремети ћелијску сигнализацију и инхибиционо утиче на ове процесе. Овакав наизглед супротан ефекат показују и многи имуномодулатори који стимулишу активност мирујућих лимфоцита (на почетку имунске реакције) и инхибирају већ активиране лимфоците када је потребно започету реакцију и контролисано зауставити (English, 2013; Trivanović и сар., 2013; Вуаџ и сар., 2016).

Примена PTU је и у селенадекуватним и селендефицитним условима имала исти, изражен инхибиторни ефекат на популацију Б ћелија слезине. Како нисмо нашли податке који би потврдили директно имунотоксично дејство PTU на популације ћелија слезине у дози и временском периоду примењеним у нашем испитивању, добијене резултате смо покушали да објаснимо као доминантни утицај измењеног тиреоидног статуса. Овакав приступ оправдава и чињеница да је у нашем огледу за индукцију хипотиреозе коришћена доза PTU у опсегу доза које су користили други аутори у испитивањима утицаја хипотиреозе на имунске параметре код пацова (Watanabe и сар., 1995; Klecha и сар., 2000; Klecha и сар., 2006; Duarte и сар., 2003; Rooney и сар. 2003; Nakamura и сар., 2007; Роксандић и сар., 2015).

Значај тиреоидних хормона за развој и функцију Б лимфоцита је потврђен у бројним истраживањима, а на њихов директан утицај указује експресија рецептора за тиреоидне хормоне у овим ћелијама (Hastings и сар.,

1997; Arpin и сар., 2000; De Vito и сар., 2011). Дефицит тиреоидних хормона највише утиче на Б лимфопоезу, тачније на пролиферацију прекурсора Б ћелија (Montecino-Rodriguez и сар., 1997; Foster и сар., 1999). Hastings и сар. (1997) описују и различиту експресију iRNK за  $\alpha 1$  (рецептор који везује T3) и  $\alpha 2$  (рецептор који не везује T3) у Б лимфоцитима у зависности од нивоа диференцијације ћелија, са највишим односом  $\alpha 1/\alpha 2$  рецептора у пре-Б ћелијама и меморијским Б ћелијама, а релативно ниским у девичанским Б лимфоцитима и плазма ћелијама, што потврђује већи значај T3 у ранијим фазама развоја Б лимфоцита и ћелијама које су укључене у секундарни имунски одговор. Fonseca Bloise и сар. (2014) су утврдили и да концентрација T3 има различит утицај на различите субпопулације Б лимфоцита слезине миша, као и да вишеструко повећан ниво T3 у односу на физиолошке вредности подстиче њихову диференцијацију у плазма ћелије.

Релативна заступљеност Б лимфоцита у укупним ћелијама слезине, као и њихов апсолутни број је код пацова третираних са PTU био значајно смањен. Како је пролиферација прекурсора Б ћелија у костној сржи позитивно регулисана хормонима тиреоидне осовине, сматрамо да је дефицит хормона изазвао смањену пролиферацију ћелија овог развојног стадијума што је за последицу имало и смањен број зрелих Б лимфоцита у слезини. Arpin и сар. (2000) наводе да делеција тиреоидних рецептора у Б лимфоцитима мишева доводи до значајног смањења заступљености популације зрелих Б лимфоцита у слезини, првенствено преко утицаја на прогениторске Б ћелије у примарним лимфатичним органима. Како се дефицит тиреоидних хормона првенствено повезује са негативним утицајем на пролиферацију Б ћелија, могуће и да је њихов смањен ниво инхибирао и пролиферацију Б ћелија у слезини након контакта са антигеном.

Да хипотиреоза индукована применом PTU у концентрацијама од 1,5 ppm до 200 ppm доводи до смањења процента Б лимфоцита у слезини потврђују испитивања и других аутора (Роксандић и сар., 2015; Nakamura и сар. 2007; Rooney и сар., 2003). Као и у нашем истраживању, Nakamura и сар. (2007) и Rooney и сар. (2003) бележе израженији утицај примене PTU на Б популацију ћелија слезине у односу на популацију T ћелија и NK ћелија. Чињеница да је у



раду Rooney и сар. (2003) забележено брже обнављање популација Т и НК ћелија, потврђује да је популација Б ћелија осетљивија на хипотиреоидни статус и да је дужи период потребан за њено обнављање. За разлику од описаних огледа, Watanabe и сар. (1995) након примене PTU у концентрацији вишој него у нашем огледу (0,1%) током 8 недеља, и поред хипотиреозе потврђене на основу нивоа fT4, нису установили измене у процентуалној заступљености Б ћелија (CD19+) у слезинама одраслих женки мишева након 8 недеља третмана. У овом испитивању није забележен ни значајан утицај примене PTU на телесну масу јединки након 8, али ни након 32 недеље огледа. С обзиром да су ова испитивања рађена на одраслим женкама мишева, можемо само да претпоставимо да су полни хормони имали протективни утицај на Б лимфоците у овом експерименталном моделу и због тога су резултати значајно различити од резултата других истраживачких група.

Самостална примена јопаноичне киселине је такође изазвала смањење релативне заступљености и броја Б лимфоцита у селенадекватним (Se+PTU-IA+) и селендефицитним (Se-PTU-IA+) условима, у односу на контролну селенадекватну групу, иако у овим групама није забележена системска хипотиреоза. Инхибиторно деловање јопаноичне киселине је било израженије у условима адекватног снабдевања селеном, па је утврђена значајна разлика у броју Б лимфоцита између селенадекватне (Se+PTU-IA+) и селендефицитне (Se-PTU-IA+) групе. Објашњење за селективно инхибиторно деловање јопаноичне киселине на популацију Б лимфоцита нисмо нашли у доступној литератури. Под претпоставком да стимулација имунског система индукује појачану експресију дејодиназе типа 2 на локалном нивоу и то независно од системског тиреоидног статуса, измене популације Б лимфоцита би се могле објаснити кроз утицај јопаноичне киселине на различите популације хематопоеетских (Т лимфоцити, моноцити, дендритичне ћелије) и нехематопоеетских ћелија (фоликуларнодендритичне ћелије и друге стромалне ћелије хематопоеетског и лимфног ткива) од значаја за нормалну функцију Б лимфоцита, а за које је (барем за неке од њих) показано да експримирају дејодиназу 2 (Braverman и Cooper, 2012; Kwakkel и сар., 2014).

Посебно интересантан је резултат добијен у селендефицидној групи третираној са оба блокатора дејодиназа (Se-PTU+IA+). У овој огледној групи је и поред системске хипотиреозе забележена највећа процентуална заступљеност Б лимфоцита ( $17,2 \pm 7,2\%$ ), значајно већа него у свим осталим огледним групама укључујући контролну Se+PTU-IA- групу и одговарајући селенадекватан пар (Se+PTU+IA+), мада је апсолутни број ћелија био нижи, али не значајно, него у селенадекватној контролној групи. Овај резултат је очигледно последица интеракције примене оба инхибитора дејодиназа и дефицита селена. Иако за овај резултат у литератури нисмо пронашли директно објашњење, могуће је да су системски и локално измењени тиреоидни статус уз дефицит селена, узроковали промену односа субпопулација Т ћелија слезине, или других ћелија значајних за функцију Б лимфоцита. У литератури је описано да дефицит селена (Huang, 2012) као и хипотиреоза (Nakamura и сар., 2007; Pacini и сар. 1987; Erf, 1983) могу да утичу на однос и заступљеност субпопулација Т лимфоцита. Резултати нашег огледа показују да је једино у овој групи забележена промена у односу посматраних субпопулација Т лимфоцита, у корист меморијских у односу на девичанске и ефекторске Т ћелије. Могуће је да су се у овој групи, услед супресије синтезе и периферне активације тиреоидних хормона и изразитог нарушавања хомеостазе, укључили механизми и метаболички путеви који су довели до обнављања популације Б лимфоцита, тачније до повећања њихове процентуалне заступљености у односу на контролну групу.

## **6.5. Т лимфоцити**

### **6.5.1. Укупни Т лимфоцити**

Т лимфоцити представљају фенотипски и функционално хетерогену популацију лимфоцита. Ова популација ћелија, у нашем огледу диференцирана од осталих ћелија на основу експресије површинског маркера CD3<sup>+</sup>, била је доминантна у слезинама пацова у свим огледним групама, са заступљеношћу

од  $55,0 \pm 10,0\%$  од укупних леукоцита слезине у контролној селенадекватној групи (Se+PTU-IA-).

Селендефицитна исхрана у трајању од седам недеља и потврђени дефицит селена у плазми нису имали утицај на релативну заступљеност и апсолутни број укупних Т лимфоцита. Иако Shrimali и сар. (2008) описују да потпуна делеција селенопротеина у Т ћелијама доводи до смањења процентуалне заступљености од око 50% у слезинама  $\Delta trspT$  мишева, ови резултати се не могу директно упоређивати са нашим резултатима. Промене у нашем огледу су последица нутритивног дефицита селена и, за разлику од циљаног и потпуног изостанка експресије свих селенопротеина у једној ћелијској линији, одражавају се различитим интензитетом на различите ћелије и ткива у организму. Са друге стране, Vega и сар. (2007) у слезинама мишева са селендефицитном исхраном (0,02 ppm) током 50 дана бележе повећање процентуалне заступљености субпопулација CD4+ и CD8+ Т лимфоцита у односу на селенадекватну контролу, без значајне промене у њиховом односу и уз истовремено смањење укупног броја ћелија слезине, што је у складу са резултатима нашег огледа. Mulhern и сар. (1985) уочавају утицај дефицита селена на популацију Т лимфоцита тек у другој генерацији селендефицитних мишева, и то пропорционално укупној редукцији телесне масе. На мању осетљивост на дефицит селена популације Т у односу на Б лимфоците указују и Marsh и сар. (1986), који су утврдили да дефицит селена инхибира развој тимуса тек уз истовремени дефицит витамина Е. Мању осетљивост Т популације потврђују и Ueno и сар. (2008), који су утврдили да слезина и тимус имају приоритет у снабдевању селеном у условима његовог дефицита. Ови истраживачи потврђују већу осетљивост глутатион пероксидазе, него тиоредоксин редуктазе, на дефицит селена код спленоцита. На основу добијених резултата, закључују да је за митогенезу Т ћелија довољан низак ниво селена и да је у овом процесу кључан ензим тиоредоксин редуктаза, за коју је карактеристично и приоритетно обнављање након надокнаде селена.

Примена јопаноичне киселине је у Se+PTU-IA+ групи узроковала повећање процентуалне заступљености популације Т лимфоцита док утицај на апсолутни број Т лимфоцита није био изражен. У нашим експериментима

нисмо код ове групе пацова пронашли знаке системске хипотиреозе и сматрамо да, с обзиром да није дошло до промене аполутног броја Т лимфоцита, повећање процента Т лимфоцита у укупним ћелијама слезине рефлектује смањење процента других ћелијских популација, пре свега Б лимфоцита. На нивоу тимуса и Т лимфоцита је потврђена експресија TSH рецептора (Dutton и сар., 1997; Paschke и Geenen, 1995; Bodey и сар., 2000; van der Weerd и сар., 2014), па је други могући разлог за повећану процентуалну заступљеност Т лимфоцита и благо, али значајно виши ниво TSH уз еутиреоидне вредности Т3 и Т4. Csaba и Pallinger (2009) описују да TSH позитивно регулише концентрацију Т3 у тимоцитима *in vitro* и *in vivo*. Примена јопаноичне киселине код селендефицирних пацова није узроковала значајну промену ни процентуалне заступљености ни апсолутног броја Т лимфоцита у односу на контролу и поред благо повишеног нивоа системског Т3.

У обе групе третиране пропиотиоурацилом (Se+PTU+IA-и Se-PTU+IA-) процентуална заступљеност популације укупних Т лимфоцита је била значајно виша него у селенадекватној контролној групи и оне се, са просечном заступљеношћу ових ћелија од 73,3%, међусобно нису разликовале. Сличне резултате код неимунизованих јединки бележе и Rooney и сар. (2003) и Nakamura и сар. (2007). Повећање процентуалне заступљености Т лимфоцита у нашем огледу није резултирало и повећањем њиховог апсолутног броја, што је такође у складу са резултатима Rooney и сар. (2003.) и Nakamura и сар. (2007). Апсолутни број Т лимфоцита је у групама третираним са PTU био значајно мањи у односу на селенадекватну контролну групу само у условима дефицита селена. Csaba и сар. (1973; 1974) утврђују да тимус може да веже јод и доказују присуство Т3 у тимоцитима и лимфоцитима периферне крви пацова, за који наводе да је можда локалног (екстратиреоидног) порекла и да производња и акумулација Т3 у Т лимфоцитима и његова паракрина/аутокринна секреција за циљ имају одржавање локалног нивоа Т3 у условима тиреоидне инсуфицијенције (Csaba и сар. 2004), што би указало на мањи утицај нивоа тиреоидних хормона у плазми на Т лимфоците у односу на Б лимфоците. Molinero (1995) потврђује присуство дејодиназе типа 2 у тимусу. Овај ензим је присутан и у тимоцитима (незрелим Т лимфоцитима) и у ћелијама строме и по

својим карактеристикама одговара D2 типу присутном у другим ткивима, укључујући зависност од тиреоидног статуса и пораст активности у хипотиреоидизму (Molinero, 1995). Треба имати у виду да тимус код пацова ове старости још увек није инволуирао и то би могло да објасни чињеницу да се Se+PTU+IA-група није значајно разликовала од контролне групе.

У Se-PTU+IA- групи је забележен значајно нижи ниво циркулишућег T3 и након 7 недеља огледа, то јест изражена системска хипотиреоза. Како је D2 селензависан ензим, вероватно је да је у овој групи њена активност била редукована, што је за последицу имало да се Se-PTU+IA- група разликује од свог селенадекватног пара и да значајност разлике у односу на контролну групу овде буде израженија. Међутим, овај резултат се може објаснити и смањењем укупне телесне масе која се рефлектовала и на целуларност слезине и апсолутни број Т лимфоцита који су били доминантна популација ћелија у слезини.

Иако у групама које су истовремено третиране са оба инхибитора дејодиназа (PTU+IA+) није забележена промена у релативној заступљености популација Т ћелија, овде је утврђено најизраженије смањење апсолутног броја Т лимфоцита у односу на контролну селенадекватну групу, са израженијим променама у условима дефицита селена. Објашњење за израженије промене у броју Т лимфоцита у овим групама би могла бити инхибиција локалне конверзије T4 у T3, деловањем јопаноичне киселине на дејодиназу типа 2 на нивоу тимуса, поред системске хипотиреозе. Инхибиција D2 би за последицу имала додатно смањен ниво T3 на нивоу тимуса и смањену пролиферацију Т ћелија, а како се ради о селеноензиму то би било још израженије у селендефицитној групи. Као и у селендефицитној групи третираној само пропилтиоурацилом, овај резултат се може објаснити и смањењем укупне телесне масе која се рефлектовала и на целуларност слезине и апсолутни број Т лимфоцита, као доминантну ћелијску популацију. У складу са наведеним, наши резултати би се могли објаснити утицајем примењених третмана на апсолутни број Т лимфоцита преко утицаја на локални ниво тиреоидних хормона.

## 6.5.2 Субпопулације Т лимфоцита

У оквиру укупне популације Т лимфоцита, диференциране су две субпопулације на основу експресије CD45RA површинског антигена.

Након позитивне и негативне селекције, Т ћелије напуштају тимус као зрели, девичански Т лимфоцити. Уколико не препознају антиген, ове ћелије бивају елиминисане апоптозом. Уколико ступе у контакт са специфичним антигеном, оне пролиферишу и диференцирају се у ефекторске ћелије, од којих већина мигрира у периферна ткива где остварује своју улогу. По уклањању антигена, највећи број ефекторских ћелија изумире, а мали пул ћелија преостаје и развија се у дугоживеће меморијске Т ћелије. Девичанске и ефекторске Т ћелије карактерише експресија CD45RA маркера (CD45RA+), док меморијске Т ћелије не експримирају (CD45RA-).

У свим испитиваним групама доминантна популација у слезини је била субпопулација меморијских, CD45RA- Т лимфоцита. Анализом односа ове две субпопулације по огледним групама, утврђено је да се једино селендефицитна група која је третирана истовремено са оба инхибитора дејодиназа значајно разликовала од селенадекватне контролне групе (Se-PTU+IA+). У овој групи је забележено смањено процентуално учешће субпопулације CD45RA+ Т лимфоцита (девичанских и ефекторских Т лимфоцита), што указује или на њихову редуковану пролиферацију или на повећану елиминацију апоптозом у условима дефицита селена и системске хипотиреозе. Механизми којима се ови процеси остварују остају да буду ближе утврђени у наредним истраживањима.

## 6.6. NK ћелије

NK ћелије слезине су у нашем огледу идентификоване и диференциране на основу експресије површинског маркера NKR-P1A. Просечна заступљеност популације NK ћелија у селенадекватној контролној групи (Se+PTU-IA-) била је  $16,2 \pm 2,1\%$ .

Дефицит селена (Se-PTU-IA-) у трајању од седам недеља је довео до смањења заступљености популације NK ћелија у слезинама пацова на

11,1±3,5%. Испитивања доступна у литератури се претежно фокусирају на утицај статуса селена на цитолитичку активност NK ћелија, при чему су резултати контрадикторни и показују 1) изостанак ефекта дефицита селена (Poffenbarger и сар., 1989), 2) дозно зависни стимулациони (Talcott и сар., 1984; Kiremidjian-Schumacher и Roy, 1996 и Kiremidjian-Schumacher и Roy, 1998) или 3) инхибициони ефекат суплементације (Nair и Schwartz, 1990). Стимулациони ефекат селена на цитолитичку активност се генерално повезује са појачаном експресијом рецептора за IL2 и стимулацијом функционалног сазревања NK ћелија. Иако нисмо нашли податке о утицају дефицита селена на заступљеност популације NK ћелија слезине код одраслих јединки, забележени модулаторни ефекат потврђују Dylewski и сар. (2002) у огледу на потомству пореклом од мајки храњених селендефицирном храном (0,02 mg/kg) током гравидитета и 10 дана лактације. Ови аутори описују смањење заступљености NK ћелија слезине за 33% у односу на контролне вредности, с тим што су ови резултати добијени код јединки старих 10 дана, тј. последица су матерналног дефицита селена.

У групама третираним јопаноичном киселином није забележена системска хипотиреоиза, нити разлика у релативној заступљености и броју NK ћелија у односу на контролну групу. Уочено је да је у Se-PTU-IA+ групи број ћелија ове популације био виши него у осталим селендефицирним групама, иако без статистичке значајности, што је вероватно последица веће укупне целуларности слезине у овој групи у односу на остале селендефицирне групе.

Примена пропилтиоурацила и код селенадекватних и код селендефицирних животиња није утицала на процентуалну заступљеност NK ћелија у слезини у односу на контролну групу. Слично нашим резултатима, Streilein-Stein и сар. (1987) не бележе разлику у броју NK ћелија слезине између хипотиреоидне (након 6 недеља третмана пропилтиоурацилом) и еутиреоидне групе мишева. Rooney и сар. (2003) су показали да примена PTU (200 ppm) у прве три недеље живота доводи до повећања процентуалне заступљености популације NK ћелија у слезини након примене PTU (200 ppm), али до смањења апсолутног броја NK ћелија, и бележе релативно брз опоравак ове популације ћелија након прекида третмана. Provinciali и сар. (1987) су показали да тироксин не утиче на интеракцију са IL-2, али повећава осетљивост NK

ћелија на IFN- $\gamma$  *in vitro*, док примена пропилтиоурацила инхибира одговор NK ћелија на стимулацију IFN- $\gamma$ . Наведени подаци указују на могућност различитог утицаја тироидних хормона на NK ћелије у одговору на стимулацију цитокинима у условима имунизације пацова овчијим еритроцитима.

У групи селенадекватних пацова које је третирана пропилтиоурацилом и јопаноичном киселином уочено је смањење процента NK ћелија. Између ове групе и групе третиране само пропилтиоурацилом није уочена разлика у нивоу циркулишућег TSH, T4 и T3, чији ниво је достигао вредност забележену у контролној групи. Међутим, процентуална заступљеност NK ћелија је била двоструко нижа у групи третираној са оба инхибитора. Локална експресија дејодиназе типа 2 на нивоу костне сржи и/или слезине пацова, која би нам могла објаснити разлику у добијеним резултатима као последицу израженије локалне хипотиреозе није описана. Међутим, описана је повећана експресија дејодиназе типа 2 у ћелијама строме различитих ткива *in vitro* и *in vivo* у условима инфламације односно активације имунског одговора различитим антигенима (Fekete и сар., 2004; Laminard и сар., 2011; Varca-Mayo и сар., 2011; Ma и сар., 2011; Wittmann и сар., 2014), која би можда за циљ имала локалну продукцију T3 и његово паракрино деловање (Wittmann и сар., 2014). Иако ми нисмо одређивали локалну активност дејодиназа у слезини могуће је да је би она била експримирана у нашем експерименту јер су пацови били имунизовани овчијим еритроцитима.

С друге стране, примена пропилтиоурацила појединачно или у комбинацији са јопаноичном киселином је у селендефицитним групама узроковала повећање заступљености популације NK ћелија у односу на нетретирану селендефицитну групу. У условима овако поремећеног статуса тироидних хормона се или укључују „резервни“ хомеостатски механизми који враћају процентуалну заступљеност NK ћелија на нормалне вредности, или повећан проценат ћелија заправо рефлектује смањење других популација леукоцита слезине. У овом моменту не можемо са сигурношћу да тврдимо који је од ова два процеса био доминантан у нашем експерименту.



Апсолутни број NK ћелија је био статистички значајно смањен у селенадекватној групи третираној са оба инхибитора и у селендефицичним групама третираним пропилиптоурацилом и вероватно је био последица смањене укупне целуларности слезине и телесне масе у овим групама.

## **6.7. Хуморални имунитет**

### **6.7.1. Титар природних IgM реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми пацова**

Природна антитела су присутна у серуму неимунизованих животиња и производи их посебна субпопулација самообнављајућих Б лимфоцита (Б-1 лимфоцити), без апсолутне потребе за стимулацијом егзогеним антигенима (Schwartz-Albiez и сар., 2009; Ochsenbein и Zinkernagel, 2000). Већина природних антитела је IgM изотипа. Мада је њихово присуство одавно познато, улога им није довољно објашњена. Ова антитела препознају филогенетски конзервативне микробне антигене и неке аутоантигене који по хемијској структури могу бити фосфолипиди, угљени хидрати, једноланчане DNA и пептиди. Сматра се да су ова антитела део прве линије одбране организма од различитих патогена, да учествују у одржавању ткивне хомеостазе и имају регулациону улогу у процесима акутне и хроничне инфламације (Schwartz-Albiez и сар., 2009). Међутим, ова антитела су такође полиреактивна и могу бити у интеракцији са различитим сопственим или страним антигенима, па могу имати улогу и у патогенези аутоимуних болести (Cohen, 1986).

У нашем експерименту смо испитивали реактивност IgM антитела према антигенима овчијих еритроцита пре имунизације. Иако се имунизација овчијим еритроцитима примењује у имунотоксикологији за испитивање Т-зависног антигенског одговора (Ladics, 2007) антигенска структура мембране ових ћелија је комплексна и оне поред поред Т зависних антигена експримирају и конзервативне антигене које могу препознати природна IgM антитела. Да ова антитела припадају пулу природних антитела закључили смо на основу одсуства герминативних центара у слезини (*резултати нису приказани*) и

непостојања IgG антитела реактивних са овчијим еритроцитима код неимунизованих пацова.

У нашем испитивању нисмо установили утицај хипотиреозе на титар природних IgM реактивних са антигенима овчијих еритроцита, али је дефицит селена утицао стимулативно на синтезу ових антитела. Подаци о утицају дефицита селена на титар природних антитела нису доступни у литератури. Повећање титра природних IgM би могло да има протективну улогу, јер ова антитела могу да се вежу и да неспецифично неутралишу микробне антигене, индукују синтезу протеина акутне фазе, реагују са ефекторским ћелијама стеченог имунског одговора и стимулишу синтезу антиген специфичних IgG антитела, супримирају инфламаторни одговор посредован ћелијама урођеног или стеченог имунитета, као и да спрече имунски одговор посредован аутоимуним Б и Т лимфоцитима (Boes, 2000; Grönwall и сар., 2012; Lobo, 2016).

Међутим, имајући у виду да се дефицит селена повезује са појавом и прогресијом неких аутоимуних болести какви су Хашимотов тиреоидитис и реуматоидни артритис (Tarp, 1985; Duntas, 2015), као и да нека аутоантитела која припадају пулу природних IgM појачавају патолошки измењен имунски одговор (Boes, 2000; Grönwall и сар., 2012; Lobo, 2016; Li и сар., 2014), повећање титра природних IgM не мора нужно да има протективну улогу. За разумевање и правилну интерпретацију добијених резултата неопходна су даља испитивања утицаја статуса селена на титар природних антитела, која је потребно спровести на анималним моделима уз примену мање комплексних антигена од оног коришћеног у нашем испитивању.

#### **6.7.2. Титар IgM и IgG антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита у плазми пацова након примарне и секундарне имунизације суспензијом овчијих еритроцита**

Испитивање имунског одговора на овчије еритроците (SRBC) код пацова представља стандарни тест за испитивање имунотоксичности супстанци. Како су овчији еритроцити Т-зависни антиген, имунски одговор

зависи од интеракције између неколико типова имунских ћелија (антиген-презентујуће, Т ћелије, Б ћелије) и различитих цитокина (Ladics, 2007) и тако омогућује генералну процену очуваности имунске функције организма.

У свим испитиваним групама у нашем експерименту је након имунизације овчијим еритроцитима детектован значајан титар специфичних IgM и IgG антитела. Упркос чињеници да су примењени третмани драстично смањивали проценат и апсолутни број Б лимфоцита слезине у свим групама (са изузетком седелендефицидне групе третиране са оба инхибитора; Se-PTU+IA+) очигледно је да је секретациона способност Б лимфоцита/плазма ћелија који синтетишу ова антитела остала очувана. У нашем експерименту нисмо уочили статистички значајне разлике у просечним вредностима титра специфичних антитела. Међутим, треба истаћи да је у свим огледним групама забележена висока варијабилност у индивидуалном имунском одговору на примењени антигенски систем. Доступни радови о утицају статуса селена на хуморални имунски одговор генерално дају неконзистенте резултате и показују да ефекат његовог дефицита или суплементације зависи од бројних фактора: врсте и старости животиње, типа примењеног антигена, нутритивног статуса пре суплементације, истовременог дефицита других нутријената, итд (Mulhern и сар., 1985, Sheffy и Schultz, 1978; Marsh и сар., 1981, Eskew и сар., 1985).

Велике индивидуалне варијације титара специфичних IgM антитела могу бити последица комплексне антигенске структуре овчијих еритроцита и чињенице да у нашем експерименту није могло бити утврђано која од ових IgM антитела припадају пулу имуних или пулу природних антитела. За добијање прецизнијег одговора на утицај примењеног третмана на титар специфичних антитела би требало користити мање комплексне Т зависне антигене.

Двострука имунизација спроведена овчијим еритроцитима као Т зависним антигенима индуковала је значајну синтезу специфичних антитела. Значајна разлика у титру специфичних IgG између огледних група није могла да буде статистички доказана. И ово одсуство разлике у титру антитела се може тумачити великом комплексношћу антигенског система овчијих еритроцита и комплексом ћелијским миљеом који је неопходан за индукцију синтезе IgG антитела: дендритичне ћелије, макрофаги, Т лимфоцити и др. За

сваки од ових ћелијских типова је показано да је њихова функција модулисана хормонима штитасте жлезде или селеном (Huang и сар., 2012; DeVito и сар., 2011).

Резултати показују да се условима нашег огледа третман инхибиторима дејодиназа са и без нутритивног дефицита селена није одразио на укупни титар специфичних IgM и IgG синтетисаних у примарном и секундарном имунском одговору на антигене овчијих еритроцита. Остаје нејасно да ли је за овај ефекат одговорна „резистентност“ антиген-специфичних Т и Б лимфоцита, или пак „резистентност“ аксесорних ћелија укључених у имунски одговор на испитиване третмане. Такође, иако у нашем раду није показано да примењени третмани доводе до промене укупног титра IgM и IgG антитела реактивних са овчијим еритроцитима, не може се искључити могућност постојања инхибиционог или стимулационог ефекта на синтезу имуних IgM и IgG према појединачним, по хемијској структури различитим, антигенима ових ћелија.

## 7. ЗАКЉУЧЦИ

1. Код пацова којима је ускраћен селен у храни концентрација селена у крви и активност селеноензима глутатион пероксидаза (GPx) у еритроцитима и крвној плазми били су значајно нижи него у селенадекватним групама. У групама пацова третираним само пропилтиоурацилом (PTU), или комбинацијом PTU и јопаноичне киселине (IA), уочена је системска хипотиреоза: значајно нижа концентрација тријодтиронина (T3) и виши ниво тиреостимулирајућег хормона (TSH) у поређењу са нетретираним животињама; за разлику од тога, третман пацова са IA није довео до системске хипотиреозе.

2. Дефицит селена код пацова довео је до смањене продукције водоник пероксида од стране макрофага. Просечна продукција водоник пероксида код селенадекватних група пацова третираних инхибиторима дејодиназа није се значајно разликовала у односу на контролу, док је код селендефицитних пацова била значајно мања у поређењу са контролном групом и са одговарајућим селенадекватним групама.

3. Ниво адхеренце перитонеалних макрофага селенадекватних пацова третираних инхибиторима дејодиназа се 10., 30. и 60. минута инкубације није разликовао од контролне групе. Код селендефицитних животиња, ниво адхеренце перитонеалних макрофага нетретиране групе и групе третиране комбинацијом PTU и IA је био, у односу на контролну групу благо повишен 10. минута, непромењен 30. минута и изразито повишен 60. минута. Код селендефицитних пацова, само макрофаги групе третиране IA су имали 10. и 30. минута нижи ниво адхеренце у односу на нетретирану селендефицитну групу. Након 60 минута све селендефицитне групе третиране инхибиторима су имале значајно нижи ниво адхеренце у односу на нетретирану селендефицитну групу.

4. Ниво адхеренце перитонеалних макрофага селенадекватних пацова равномерно је и значајно растао током 60 минута у групама третираним PTU или IA, док је код селендефицитних група 60. минута уочен значајан пораст у нетретираној групи и групи третираној комбинацијом PTU и IA.

5. Укупан број леукоцита (целуларност) слезине био је значајно мањи у свим групама пацова код којих је постојала системска хипотиреоза. Констатована је значајна корелација између телесних маса и целуларности слезине пацова.

6. Процентуална заступљеност Б лимфоцита у односу на укупан број леукоцита слезине, као и њихов апсолутан број, били су значајно нижи у свим групама селенадекватних и селендефицичних пацова у поређењу са контролном групом; изузетак је група селендефицичних пацова третираних комбинацијом РТУ и IA у којој је процентуална заступљеност Б лимфоцита била значајно виша од контроле, док се апсолутан број није разликовао.

7. Процентуална заступљеност Т лимфоцита у односу на укупан број леукоцита слезине, била је значајно већа у групама третираним само РТУ и у селенадекватној групи третираној само IA. Апсолутни број Т лимфоцита слезине био је значајно мањи у групама пацова третираних комбинацијом РТУ и IA, и селендефицичних пацова третираних само РТУ.

8. У популацији укупних Т лимфоцита слезине на основу експресије CD45RA антигена код свих група пацова детектоване су субпопулације CD45RA- меморијских Т лимфоцита и CD45RA+ девичанских/ефекторних Т лимфоцита. У свим групама пацова субпопулација CD45RA- Т лимфоцита је била доминантна. Удео субпопулација CD45RA+ и CD45RA- Т лимфоцита је био непромењен у односу на контролну групу у свим групама пацова са изузетком селендефицичне групе третиране комбинацијом РТУ и IA код којих је удео меморијских CD45RA- Т лимфоцита је био значајно већи, а удео девичанских/ефекторних CD45RA+ Т лимфоцита значајно нижи у односу на остале групе.

9. Процентуални удео НК ћелија у популацији укупних леукоцита слезине био је значајно мањи у поређењу са контролом у групи селенадекватних пацова третираних комбинацијом РТУ и IA и у селендефицичној нетретираној групи. Апсолутни број НК ћелија слезине код селенадекватних животиња био је значајно нижи у односу на контролу у групама третираним комбинацијом РТУ и IA и код селендефицичне групе третиране само РТУ.

10. Титар природних IgM антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита није се разликовао међу групама селенадекватних пацова, док је код селендефицичних животиња измерен значајно већи титар IgM антитела у односу на контролу код нетретираних и група третираних само PTU и само IA.

11. Након имунизације пацова овчијим еритроцитима, титар IgM и IgG антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита није се разликовао између експерименталних група.

## 8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЕ

1. Abou-Rabia N., Kendall M.D. (1994). Involution of the rat thymus in experimentally induced hypothyroidism. *Cell Tissue Res*, 277, 447-455.
2. Adler V., Yin Z., Tew K.D., Ronai Z. (1999). Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*, 18, 6104–6111.
3. Ahrens I., Ellwanger C., Smith B.K., Bassler N., Chen Y.C., Neudorfer I., Ludwig A., Bode C., Peter K. (2008). Selenium supplementation induces metalloproteinase-dependent L- selectin shedding from monocytes. *J Leukoc Biol*, 83, 1388–1395.
4. Akiyama S.K. (1996). Integrins in cell adhesion and signaling, *Hum Cell*, 9(3), 181-6.
5. Ansong E., Yang W., Diamond A.M. (2014). Molecular cross-talk between members of distinct families of selenium containing proteins. *Mol Nutr Food Res*, 58(1), 117-23.
6. Arpin C., Pihlgren M., Fraichard A., Aubert D., Samarut J., Chassande O., Marvel J. (2000). Effects of T3Ra1 and T3Ra2 gene deletion on T and B Lymphocyte development. *The Journal of Immunology*, 164, 152–160.
7. Arthur J.R., Nicol F., Hutchinson A.R., Beckett G.J. (1990). The effects of selenium depletion and repletion on the metabolism of thyroid hormones in the rat. *J Inorg Biochem*, 39, 101-108.
8. Auger M.J. (1989). Mononuclear phagocytes. *BMJ*, 298 (6673), 546–548.
9. Babior B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93 (5), 1464–1476.
10. Bağrıaçık E.U., Klein J.R. (2000). The thyrotropin (thyroid-stimulating hormone) receptor is expressed on murine dendritic cells and on a subset of CD45RB<sup>high</sup> lymph node T cells: functional role for thyroid-stimulating hormone during immune activation. *J Immunol*, 15, 164(12), 6158-65.
11. Baker S.S., Cohen H.J. (1984). Increased Sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Glutathione Peroxidase-Deficient Rat Granulocytes. *J Nutr*, 114, 2003-2009.
12. Baker S.S., Cohen H.J. (1983). Altered oxidative metabolism in selenium-deficient rat granulocytes. *Journal Of Immunology*, 130 (6), 2856-60.
13. Baqui M., Botero D., Gereben B., Curcio C., Harney J.W., Salvatore D., Sorimachi K., Larsen P.R., Bianco A.C. (2003). Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J Biol Chem*, 278(2), 1206-11.
14. Baqui M., Gereben B., Harney J.W., Larsen P.R., Bianco A.C. (2000). Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine



deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*, 141, 4309–4312.

15. Barca-Mayo O., Liao X.H., DiCosmo C., Dumitrescu A. Moreno-Vinasco L., Wade M.S., Sammani S., Mirzapooiazova T., Garcia J.G., Refetoff S., Weiss R.E. (2011). Role of type 2 deiodinase in response to acute lung injury (ALI) in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(49), 1321-9.
16. Barnes K.M., Evenson J.K., Raines A.M., Sunde R.A. (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 activity 1-3. *J Nutr*, 139, 199-206.
17. Bates J.M., Spate V.L., Morris J.S., St. Germain D.L., Galton V.A. (2000). Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. *Endocrinology*, 141, 2490–2500.
18. Bates J.M., St Germain D.L., Galton V.A. (1999). Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology*, 140(2), 844-51.
19. Beamer W.J., Eicher E.M., Maltais L.J., Southard J.L. (1981). Inherited primary hypothyroidism in mice. *Science*, 212, 61–3.
20. Beck M.A., Kolbeck P.C., Rohr L.H., Shi Q., Morris V.C., Levander O.A. (1994). Benign human enterovirus becomes virulent in selenium-deficient mice. *J Med Virol*, 43, 166–170.
21. Beck M.A., Nelson H.K., Shi Q., Van Dael P., Schiffrin E.J., Blum S., Barclay D., Levander O.A. (2001). Selenium deficiency increases the pathology of an influenza virus infection. *FASEB J*, 15(8), 1481-3.
22. Beckett G.J., Beddows S.E., Morrice P.C., Nicol F., Arthur J.R. (1987). Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. *Biochem J*, 248, 443–447.
23. Beckett G.J., MacDougal D.A., Nicol F., Arthur J.R. (1989). Inhibition of type I and II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. *Biochem J*, 259, 887–892.
24. Behne D., Höfer-Bosse T. (1984). Effects of a Low Selenium Status on the Distribution and Retention of Selenium in the Rat. *J Nutr*, 114, 1289-1296.
25. Behne D., Kyriakopoulos A. (2001). Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr*, 21, 453–473.
26. Behne D., Kyriakopoulos A., Meinhold H., Köhrle J. (1990). Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, 173, 1143-1149.

27. Bellingan G.J., Caldwell H., Howie S.E., Dransfield I., Haslett C. (1996). *In vivo* fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation. Inflammatory macrophages do not die locally but emigrate to the draining lymph nodes. *J Immunol*, 157, 2577–2585.
28. Bendyug G.D., Grinevich Y.A., Khranovskaya N.N., Filchakov F.V., Yugrinova L.G., Kadkalenko A.G. (2003). The state of immune system in thyroidectomized rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Immunology and Microbiology*, 135, 2, 178-181.
29. Bergh J.J., Lin X.Y., Lansing L., Mohamed S.N., Davis F.B., Mousa S., Davis P.J. (2005). Integrin  $\alpha v\beta 3$  contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146, 2864–2871.
30. Bermano G., Nicol F., Dyer J.A., Sunde R.A., Beckett G.J., Arthur J.R., Hesketh J.E. (1995). Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J*, 311(Pt 2): 425–430.
31. Berry M.J., Banu L., Larsen P.R. (1991a). Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349, 438–440.
32. Berry M.J., Kates A.L., Larsen P.R. (1990). Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. *Mol Endocrinol*, 4, 743–748.
33. Berry M.J., Kieffer J.D., Harney J.W., Larsen P.R. (1991b). Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 14155–14158.
34. Bianco A.C., Kim B.W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116, 2571–2579.
35. Bianco A.C., Salvatore D., Gereben B., Berry M.J., Larsen P.R. (2002). Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*, 23(1), 38–89.
36. Biesiada E., Adams P.M., Shanklin D.R., Bloom G.S., Stein S.A. (1996). Biology of the congenitally hypothyroid hyt/hyt mouse. *Advances in Neuroimmunology*, 6, 309-346.
37. Blalock J.E. (1992). *Neuroimmunoendocrinology*, *Chem Immunol*, 52, 1-190.
38. Blalock J.E., Johnson H.M., Smith E.M., Torres B.A. (1984). Enhancement of the *in vitro* antibody response by thyrotropin, *Biochem Biophys Res Comm*, 25, 30–34.

39. Blood D.C., Henderson J.A., Radostits O.M. (1983). Selenium and/or vitamin E deficiencies In *Veterinary Medicine*. 6th edn. London, Balliere Tindall, 1042-105.
40. Bodey B., Bodey B. Jr, Siegel SE., Kaiser H.E. (2000). The role of the reticulo-epithelial (RE) cell network in the immuno- neuroendocrine regulation of intrathymic lymphopoiesis. *Anticancer Research* 20, 1871–1888.
41. Boelen A., Boorsma J., Kwakkel J., Wieland C.W., Renckens R., Visser T.J., Fliers E. (2008). Wiersinga WM, Type 3 Deiodinase Is Highly Expressed in Infiltrating Neutrophilic Granulocytes in Response to Acute Bacterial Infection. *Thyroid*, 18 (10), 1095-1103.
42. Boelen A., Mikita J., Boiziau C., Chassande O., Fliers E., Petry K.G. (2009). Type 3 Deiodinase Expression in Inflammatory Spinal Cord Lesions in Rat Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Thyroid*, 19 (12), 1401-6.
43. Boes M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol*, 37(18), 1141-1149.
44. Bohnsack J.F., Kleinman H.K., Takahashi T., O'shea J.J., Brown E.J. (1985). Connective tissue proteins and phagocytic cell function. Laminin Enhances Complement and Fc-mediated Phagocytosis by Cultured Human Macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 161, 912-923.
45. Boveris A., Alvarez S., Bustamante J., Valdez L. (2002). Measurement of Superoxide Radical and Hydrogen Peroxide Production in Isolated Cells and Subcellular Organelles. *Methods In Enzymology*, 349, 280-287.
46. Boyne R., Arthur J.R., Wilson A.B. (1986). An in vivo and in vitro study of selenium deficiency and infection in rats. *Journal of Comparative Pathology*, 96 (4), 379-386.
47. Braga M., Cooper D.S. (2001). Clinical review 129: Oral cholecystographic agents and the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(5), 1853-60.
48. Braverman L.E., Cooper D. (2012) *Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
49. Brigelius-Flohé R., Maiorino M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830 (5), 3289–3303.
50. Broome C.S., McArdle F., Kyle J.A., Andrews F., Lowe N.M., Hart C.A., Arthur J.R., Jackson M.J. (2004). An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *Am J Clin Nutr*, 80(1), 154-62.
51. Buač M., Mojsilović S., Mišić D., Vuković D., Savić O., Valčić O., Marković D., Gvozdić D., Ilić V., Fratrić N. (2016). Circulating immune complexes of

- calves with bronchopneumonia modulate the function of peripheral blood leukocytes: In vitro evaluation. *Research in Veterinary Science*, 106, 135-142.
52. Bunglavan S.J., Garg A.K., Dass R.S., Shrivastava S. (2014). Effect of supplementation of different levels of selenium as nanoparticles/sodium selenite on blood biochemical profile and humoral immunity in male Wistar rats. *Veterinary World*, 7(12), 1075-1081.
  53. Burek C.L., Rose N.R. (2008). Autoimmune thyroiditis and ROS. *Autoimmunity Reviews*, 7, 530–537.
  54. Burk R.F., Nishiki K., Lawrence R.A., 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.
  55. Bürki H., Wimpfheimer C., Burger A., Zaunbauer W., Rösler H., Lemarchand-Béraud T. (1976). Changes of circulating thyroxine, triiodothyronine and reverse triiodothyronine after radiographic contrast agents. *J Clin Endocrinol Metab*, 43, 1203–1210.
  56. Canning M.O., Grotenhuis K., De Haan-Meulman M., De Wit H.J., Berghout A., Drexhage H.A. (2001). An abnormal adherence of monocytes to fibronectin in thyroid autoimmunity has consequences for cell polarization and the development of veiled cells. *Clin Exp Immunol*, 125(1), 10–18.
  57. Carlson B.A., Yoo M.H., Sano Y., Sengupta A., Kim J.Y., Irons R., Gladyshev V.N., Hatfield D.L., Park J.M. (2009). Selenoproteins regulate macrophage invasiveness and extracellular matrix-related gene expression. *BMC Immunol*, 10, 57.
  58. Carlson B.A., Yoo M.H., Shrimali R.K., Irons R., Gladyshev V.N., Hatfield D.L., Park J.M. (2010). Role of selenium-containing proteins in T cell and macrophage function. *Proc Nutr Soc*, 69(3), 300-10.
  59. Carreras M.C., Poderoso J.J., Cadenas E., Boveris A. (1996). Measurement of nitric oxide and hydrogen peroxide production from human neutrophils. *Methods in Enzymology*, 269, 65-75.
  60. Carter D., Fuhrman B., Aviram M. (1996). Macrophage activation with phorbol myristate acetate is associated with cellular lipid peroxidation. *Isr J Med Sci*, 32(6), 479-85.
  61. Chabaud O., Lissitzky S. (1977). Thyrotropin-specific binding to human peripheral blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 7(1), 79-87.
  62. Chatterjee S., Chandel A.S. (1983). Immunomodulatory role of thyroid hormones: in vivo effect of thyroid hormones on the blastogenic response of lymphoid tissues. *Acta Endocrinologica*, 103, 95-100.

63. Chen J.D., Evans R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 377(6548), 454-7.
64. Chen X., Yang G., Chen J., Chen X., Wen Z., Ge K. (1980). Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol Trace Elem Res*, 2(2), 91-107.
65. Cheng S.Y. (2000). Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev Endocr Metab Disord*, 1, 9–18.
66. Cheng S.Y., Leonard J.L., Davis P.J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone actions, *Endocr Rev*, 31(2), 139-70.
67. Cohen I.R. (1986). Regulation of autoimmune disease physiological and therapeutic, *Immunol Rev*, 94, 5–21.
68. Cohen M.S., Ryan J.L., Root R.K. (1981). The oxidative metabolism of thio glycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: The relationship between oxygen, superoxide anion, hydrogen peroxide and the effect of monolayer formation. *J Immunol*, 127, 1007-11.
69. Cook A.D., Braine E.L., Hamilton J.A. (2003). Inflammatory Response Implications for the Nature of the Macrophages Is Stimulus Dependent: The Phenotype of Inflammatory. *J Immunol*, 171, 4816-4823.
70. Cooper D.S. (2000). Treatment of thyrotoxicosis. In: Braverman L.E. & Utiger R.D., eds, *Werner & Ingbar's. The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text*, 8th Ed., Philadelphia, PA, J.B. Lippincott, 691–715.
71. Costa Rosa L.F.B.P., Safi D.A., Curi R. (1995). Effect of Hypo- and Hyperthyroidism on the Function and Metabolism of Macrophages in Rats. *Cell Biochemistry and Function*, 13, 141-147.
72. Coutelier J.P., Kehrl J.H., Bellur S.S., Kohn L.D., Notkins A.L., Prabhakar B.S. (1990). Binding and Functional Effects of Thyroid Stimulating Hormone on Human Immune Cells. *Journal of Clinical Immunology*, 10 (4), 204-10.
73. Croteau W., Davey J.C., Galton V.A., St. Germain D.L. (1996). Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest*, 98, 405–417.
74. Csaba G., Kiss J., Nagy S.U. (1973). Comparative studies on the <sup>125</sup>I uptake of the thyroid and thymus. *Experientia* 29, 357–358.
75. Csaba G., Kovács P., Pállinger É. (2004). Immunologically demonstrable hormones and hormone-like molecules in rat white blood cells and mast cells. *Cell Biology International* 28, 487-490.

76. Csaba G., Pállinger É. (2009). Thyrotropic hormone (TSH) regulation of triiodothyronine (T3) concentration in immune cells, *Inflamm res*, 58, 151–154.
77. Csaba G., Sudar F., Dobozy O. (1977). Triiodothyronine receptors in lymphocytes of newborn and adult rats. *Hormone and Metabolic Research*, 9(6), 499-501.
78. Csaba G., Török O., Nagy S.U. (1974). Detection of iodine-accumulating cells of the thymus in tissue culture. *Acta Biologica Hungarica*, 25, 269–274.
79. Dalla Puppa L., Savaskan N.E., Bräuer A.U., Behne D., Kyriakopoulos A. (2007). The Role of Selenite on Microglial Migration. *Ann N Y Acad Sci*, 1096, 179-83.
80. Davis P.J., Davis F.B., Cody V. (2005). Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 429–435.
81. Davis P.J., Davis F.B., Lin H.Y. (2006). L-Thyroxine acts as a hormone as well as a prohormone at the cell membrane. *Immun Endocr Metab Agents Med Chem*, 6, 235–240.
82. Davis P.J., Leonard J.L., Davis F.B. (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29, 211–218.
83. De Vito P., Balducci V., Leone S., Percario Z., Mangino G., Davis P.J., Davis F.B., Affabris E., Luly P., Pedersen J.Z., Incerpi S. (2012). Nongenomic effects of thyroid hormones on the immune system cells: New targets, old players. *Steroids*, 77, 988-995.
84. De Vito P., Incerpi S., Pedersen J.Z., Luly P., Davis F.B., Davis P.J. (2011). Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid*, 21, 879-890.
85. Diaz-Muñoz M.D., Osma-García I.C., Íñiguez M.A., Fresno M. (2013). Cyclooxygenase-2 Deficiency in Macrophages Leads to Defective p110g PI3K Signaling and Impairs Cell Adhesion and Migration. *The Journal of Immunology*, 191, 395–406.
86. Dickson R.C., Tomlison R.H. (1967). Selenium in blood and human tissues. *Clinica Chimica Acta*, 16, 311-321.
87. Dorshkind K., Horseman N.D. (2000). The Roles of Prolactin, Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor-I, and Thyroid Hormones in Lymphocyte Development and Function: Insights from Genetic Models of Hormone and Hormone Receptor Deficiency. *Endocr Rev*, 21(3), 292-312.
88. Duarte C.G., Azzolini A.E., Assis-Pandochi A.I. (2003). Effect of the period of treatment with a single dose of propylthiouracil on the antibody response in rats. *Int Immunopharmacol*, 3(10-11), 1419-27.

89. Duarte C.G., dos Santos G.L., Azzolini A.E., Assis Pandochi A.I. (2000). The effect of the antithyroid drug propylthiouracil on the alternative pathway of complement in rats. *International Journal of Immunopharmacology*, 22, 25-33.
90. Duntas L.H. (2009). Selenium and Inflammation: Underlying anti-inflammatory mechanisms. *Hormone and Metabolic Research*, 41, 443-447.
91. Duntas L.H. (2015). The Role of Iodine and Selenium in Autoimmune Thyroiditis. *Horm Metab Res*, 47(10), 721-726.
92. Dutton C.M., Joba W, Spitzweg C, Heufelder AE, Bahn RS (1997). Thyrotropin receptor expression in adrenal, kidney and thymus. *Thyroid*, 7, 879-4.
93. Dylewski M.L., Mastrob A.M., Picciano M.F. (2002). Maternal Selenium Nutrition and Neonatal Immune System Development. *Biol Neonate*, 82,122–7.
94. Eichner R.D., Smeaton T.C. (1983). Agar accumulates in rat peritoneal macrophages elicited with thioglycollate broth. *Scandinavian Journal of Immunology* 18, 259–263.
95. Engler H., Taurog A., Luthy C., Dorris M.L. (1983). Reversible and irreversible inhibition of thyroid peroxidase-catalyzed iodination by thiourea drugs. *Endocrinology*, 112(1), 86-95.
96. English K. (2013). Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 91, 19-26.
97. Erf G.F. (1993). Immune Development in Young-Adult C.RF-hyt Mice is Affected by Congenital and Maternal Hypothyroidism. *Proc Soc Exp Biol Med*, 204(1), 40-8.
98. Escobar-Morreale H.F., Obregon J.M., del Rey F.E., de Escobar M.G. (1995). Replacement Therapy for Hypothyroidism with Thyroxine Alone Does Not Ensure Euthyroidism in All Tissues, as Studied in Thyroidectomized Rats. *J Clin Invest*, 96, 2828-2838.
99. Eskew M.L., Scholz R.W., Reddy C.C., Todhunter D.A., Zarkower A. (1985). Effects of vitamin E and selenium deficiencies on rat immune function. *Immunology*, 54(1), 173–180.
100. Fabris N. (1973). Immunodepression in thyroid-deprived animals. *Clin Exp Immunol*, 15(4), 601–611.
101. Fabris N., Mocchegiani E., Mariotti S., Pacini F., Pinchera A. (1986). Thyroid Function Modulates Thymic Endocrine Activity. *J Clin Endocrinol Metab*, 62(3), 474-8.
102. Fabris N., Mocchegiani E., Provinciali M. (1995). Pituitary-thyroid axis and immune system: A reciprocal neuroendocrine –immune interaction. *Horm Res*, 43, 29–38.

103. Fabris N., Pierpaoli W., Sorkin E. (1971). Hormones and the immunological capacity. III The immunodeficiency disease of the hypopituitary Snell-Bagg dwarf mouse. *Clin exp Immunol* 9, 209-225.
104. Fang L.Q., Goeijenbier M., Zuo S.Q., Wang L.P., Liang S., Klein S.L., Li X.L., Liu K., Liang L., Gong P., Glass G.E., van Gorp E., Richardus J.H., Ma J.Q., Cao W.C., de Vlas S.J. (2015). The Association between Hantavirus Infection and Selenium Deficiency in Mainland China. *Viruses*, 7, 333-351.
105. Fekete C., Gereben B., Doleschall M., Harney J.W., Dora J.M., Bianco A.C., Sarkar S., Liposits Z., Rand W., Emerson C., Kacs Kovics I., Larsen P.R., Lechan R.M. (2004). Lipopolysaccharide Induces Type 2 Iodothyronine Deiodinase in the Mediobasal Hypothalamus: Implications for the Nonthyroidal Illness Syndrome. *Endocrinology*, 145 (4), 1649-1655.
106. Fekkes D., Hennemann G., Visser T.J. (1982). Evidence for a single enzyme in rat liver catalyzing the deiodination of the tyrosyl and the phenolic ring of iodothyronines. *Biochem J*, 201, 673–676.
107. Finch J.M., Turner R.J. (1996). Selenium, vitamin E and immunity. *Res Vet Sci*, 60(2), 97-106.
108. Flohe L., Günzler W.A., Schock H.H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*, 32(1), 132-4.
109. Flohe L., Schlegel W. (1971). Glutathione peroxidase. IV. Intracellular distribution of the glutathione peroxidase system in the rat liver. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 352, 1401–1410.
110. Fonseca Bloise F., de Oliveira F.L., Nobrega A.F., Vasconcellos R., Cordeiro A., de Paiva L.S., Taub D.D., Borojevic R., Pazos-Moura C.C., de Mello-Coelho V. (2014). High levels of circulating triiodothyronine induce plasma cell differentiation. *J Endocrinol*, 220, 305-317.
111. Forman H.J., Torres M. (2001). Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life*, 51(6), 365–371.
112. Foster M.P., Jensen E.R., Montecino-Rodriguez E., Leathers H., Horseman N., Dorshkind K. (2000). Humoral and cell-mediated immunity in mice with genetic deficiencies of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormone. *Clin Immunol*, 96(2), 140-9.
113. Foster M.P., Montecino-Rodriguez E., Dorshkind K. (1999). Proliferation of Bone Marrow Pro-B Cells Is Dependent on Stimulation by the Pituitary/Thyroid Axis. *J Immunol*, 163, 5883-5890.
114. Franklyn J.A. (1994). The management of hyperthyroidism. *N Engl J Med*, 330(4), 1731-8.



115. Friedman A., Beller D.I. (1987). The effect of adherence on the in vitro induction of cytotoxic activity by macrophages. *Immunology*, 61(4), 469–474.
116. Funari P. Jr, de Albuquerque R., Muraroli V.D.A., Raspantini L.E.R., Cardoso A.L.P., Tessari E.N.C., Alves F.R. (2012) Different sources and levels of selenium on humoral immunity of broiler chickens. *Cienc Rural*,42(1):154-159.
117. Galton V.A., Martinez E., Hernandez A., St. Germain E.A., Bates J.M., St. Germain D.L. (1999). Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. *J Clin Invest*, 103, 979–987.
118. Gärtner R., Gasnier B.C., Dietrich J.W., Krebs B., Angstwurm M.W. (2002). Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(4), 1687-91.
119. Gereben B., Goncalves C., Harney J.W., Larsen P.R., Bianco A.C. (2000). Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol Endocrinol* 14, 1697–1708.
120. Gereben B., Salvatore D., Harney J.W., Tu H.M., Larsen P.R. (2001). The human, but not rat, *dio2* gene is stimulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *Mol Endocrinol*, 15(1), 112–124.
121. Germain D.L. (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 (2), 890–893.
122. Ghosn E., Cassado A.A., Govoni G.R., Fukuhara T., Yang Y., Monack D.M., Bortoluci K.R., Almeida S.R., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *PNAS*, 107(6), 2568-2573.
123. Giadinis N., Koptopoulos G., Roubies N., Siarkou V., Papasteriades A. (2000). Selenium and vitamin E effect on antibody production of sheep vaccinated against enzootic abortion (*Chlamydia psittaci*). *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 23(2), 129-137.
124. Gomez I.G., Tang J., Wilson C.L., Yan W, Heinecke J.W., Harlan J.M., Raines E.W. (2012). Metalloproteinase-mediated shedding of integrin  $\beta$ 2 promotes macrophage efflux from inflammatory sites. *J Biol Chem*, 287(7), 4581-9.
125. Gordon S., Taylor P.R. (2005). Monocyte and Macrophage Heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5, 953-964.
126. Grönwall C., Vas J., Silverman G.J. (2012). Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Front Immunol*, 3, 66.

127. Günzler W.A., Steffens G.J., Grossman A., Kim S.M.A., Otting F., Wendel A., Flohe L. (1974). The aminoacid sequence of a bovine glutathione peroxidase. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 365(2), 195-212.
128. Hafeman D.G., Sunde R.A., Hoekstra W.G. (1974). Effect of Dietary Selenium on Erythrocyte and Liver Glutathione Peroxidase in the Rat. *J Nutr*, 104(5), 580-587.
129. Hara S., Shoji Y., Sakurai A., Yuasa K., Himeno S., Imura N. (2001). Effects of selenium deficiency on expression of selenoproteins in bovine arterial endothelial cells. *Biol Pharm Bull*, 4(7), 754-9.
130. Harris A.R., Fang S.L., Vagenakis A.G., Braverman L.E. (1978). Effect of starvation, nutrient replacement, and hypothyroidism on *in vitro* hepatic T4 to T3 conversion in the rat. *Metabolism*, 27 (11), 1680–1690.
131. Hastings M.L., Milcarek C., Martincic K., Peterson M.L., Munroe S.H. (1997). Expression of the thyroid hormone receptor gene, *erbA $\alpha$* , in B lymphocytes: alternative mRNA processing is independent of differentiation but correlates with antisense RNA levels. *Nucleic Acids Research*, 25 (21), 4296–4300.
132. Hawkes W.C., Kelley D.S., Taylor P.C. (2001). The Effects of Dietary Selenium on the Immune System in Healthy Men. *Biol Trace Elem Res*, 81(3), 189-213.
133. Hoffmann F.W., Hashimoto A.C., Shafer L.A., Dow S., Berry M.J., Hoffmann P.R. (2010). Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *J Nutr*, 140(6), 1155-61.
134. Hoffmann P.R., Berry M.J. (2008). The influence of selenium on immune responses. *Mol Nutr Food Res*, 52(11), 1273–1280.
135. Horlein A.J., Naar A.M., Heinzl T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M., Glass C.K. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377 (6548), 397-404.
136. Hu M.L., Chung C., Spallholz J.E. (1984). Hematologic Data of Selenium-Deficient and Selenium-Supplemented Rats. *J Inorg Biochem*, 22(3), 165-73.
137. Huang Z., Rose A.H., Hoffmann P.R. (2012). The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 16(7), 705-43.
138. Imhof B.A., Aurrand-Lions M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature Reviews Immunology* 4, 432-444.
139. Kai O., Nagase H., Ishikawa N., Suzuki M., Kakegawa T., Sato K. (1988). Effects of propylthiouracil (PTU) on the immunological status of the chicken. *Dev Comp Immunol*, 12(1), 145-156.

140. Kai O., Nagase H., Suzuki M., Kakegawa T., Sato K. (1993). Effects of hypothyroidism with treatment of an anti-thyroid drug, propylthiouracil on immune responses in chickens. *Vet Immunol Immunopathol*, 36(2), 123-35.
141. Kaiser C.A., Goumaz M.O., Burger A.G. (1986). In vivo inhibition of the 5'-deiodinase type II in brain cortex and pituitary by reverse triiodothyronine. *Endocrinology*, 119(2), 762-70.
142. Kamath J., Yarbrough G.G., Prange A.J. Jr., Winokur A. (2009). The thyrotropin-releasing hormone (TRH)-immune system homeostatic hypothesis. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(1), 20-28.
143. Kaplan M.M., Utiger R.D. (1978). Iodothyronine metabolism in liver and kidney homogenates from hypothyroid and hyperthyroid rats. *Endocrinology*, 103(1), 156-161.
144. Kasaikina M.V., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. (2012). Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models. *Biochim Biophys Acta*, 1823(9), 1633-42.
145. Khalili A.A., Ahmad M.R. (2015). A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int J Mol Sci*, 16(8), 18149-18184.
146. Khoso P.A., Yang Z., Liu C., Li S. (2015). Selenium Deficiency Downregulates Selenoproteins and Suppresses Immune Function in Chicken Thymus. *Biol Trace Elem Res*, 167(1), 48-55.
147. Kiremidjian-Schumacher L., Stotzky G. (1987). Selenium and Immune Responses. *Environmental Research*, 42(2), 277-303.
148. Kiremidjian-Schumacher L., Roy M. (1998). Selenium and immune function. *Z Ernährungswiss*, 37 (Suppl 1), 50-6.
149. Kiremidjian-Schumacher L., Roy M., Wishe H.I., Cohen M.W., Stotzky G. (1992). Regulation of cellular immune responses by selenium. *Biol Trace Elem Res*, 33, 23-35.
150. Kiremidjian-Schumacher L., Roy M., Wishe H.I., Cohen M.W., Stotzky G. (1990). Selenium and immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and production of interleukin 1 and interleukin 2. *Proc Soc Exp Biol Med*, 193 (2), 136-142.
151. Kiremidjian-Schumacher L., Roy M., Wishe H.I., Cohen M.W., Stotzky G. (1996). Supplementation with selenium augments the functions of natural killer and lymphokine-activated killer cells. *Biol Trace Elem Res*, 52(3), 227-39.
152. Kiremidjian-Schumacher L., Roy M., Wishe H.I., Cohen M.W., Stotzky G. (1994). Supplementation with selenium and human immune cell functions II. Effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cells. *Biological Trace Element Research*, 41(1-2), 115-27.

153. Klecha A.J., Genaro A.M., Gorelik G., Barreiro Arcos M.L., Dafne Magalí Silberman D.M., Schuman M., Garcia S.I., Pirola C., Cremaschi G.A. (2006). Integrative study of hypothalamus–pituitary–thyroid–immune system interaction: thyroid hormone-mediated modulation of lymphocyte activity through the protein kinase C signaling pathway. *Journal of Endocrinology*, 189 (1), 45–55.
154. Klecha A.J., Genaro A.M., Lysionek A.E., Caro R.A., Coluccia A.G., Cremaschi G.A. (2000). Experimental evidence pointing to the bidirectional interaction between the immune system and the thyroid axis. *International Journal of Immunopharmacology* 22 (7), 491-500.
155. Klein J.R. (2003). Physiological Relevance of Thyroid Stimulating Hormone and Thyroid Stimulating Hormone Receptor in Tissues other than the Thyroid. *Autoimmunity*, 36 (6-7), 417–421.
156. Klein J.R. (2006). The immune system as a regulator of thyroid hormone activity. *Exp Biol Med*, 231(3), 229-36.
157. Koller L.D., Exon J.H., Talcott P.A., Osborne C.A., Henningsen G.M. (1986). Immune Responses in Rats Supplemented with Selenium. *Clin exp Immunol*, 63 (3), 570-576.
158. Kress E., Samarut J., Plateroti M. (2009). Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: Paradox or duality?. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 313 (1-2), 36–49.
159. Kruger T.E., Smith L.R., Harbour D.V., Blalock J.E. (1989). Thyrotropin: an endogenous regulator of the in vitro immune response. *J Immunol*, 142(3), 744–747.
160. Kuiper G.G., Kester M.H., Peeters R.P., Visser T.J. (2005). Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid*, 15 (8), 787–798.
161. Kunkel S.L., Duque R.E. (1983). The macrophage adherence phenomenon: its relationship to prostaglandin E2 and superoxide anion production and changes in transmembrane potential. *Prostaglandins* 26(6), 893-904.
162. Kwakkel J., Surovtseva O.V., de Vries E.M., Stap J., Fliers E., Boelen A. (2014). A Novel Role for the Thyroid Hormone-Activating Enzyme Type 2 Deiodinase in the Inflammatory Response of Macrophages. *Endocrinology* 155 (7), 2725–2734.
163. Ladics G.S. (2007). Primary immune response to sheep red blood cells (SRBC) as the conventional T-cell dependent antibody response (TDAR) test. *J Immunotoxicol*, 4(2), 149-52.
164. Lamirand A., Ramaugé M., Pierre M., Courtin F. (2011). Bacterial lipopolysaccharide induces type 2 deiodinase in cultured rat astrocytes. *J Endocrinol*, 208, 183-192.

165. Lanni A., Beneduce L., Lombardi A., Moreno M., Boss O., Muzzin P., Giacobino J.P., Goglia F. (1999). Expression of uncoupling protein-3 and mitochondrial activity in the transition from hypothyroid to hyperthyroid state in rat skeletal muscle. *FEBS Lett*, 444(2-3), 250-4.
166. Lanni A., Moreno M., Lombardi A., Goglia F. (1996). Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat. *J Physiol*, 494 (Pt 3), 831-837.
167. Larsen P.R., Silva J.E., Kaplan M.M. (1981). Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. *Endocr Rev*, 2 (1), 87-102.
168. Laudet V., Hanni C., Coll J., Catzeflis F., Stehelin D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J*, 11 (3), 1003-1013.
169. Lazar M.A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev*, 14(2), 184-93.
170. Lazar M.A. (2003). Thyroid hormone action: a binding contract. *J Clin Invest*, 112(4), 497-499.
171. Lee B.J., Worland P.J., Davis J.N., Stadtman T.C., Hatfield D.L. (1989). Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *J Biol Chem*, 264 (17), 9724-9727.
172. Leonard J.L., Rosenberg I.N. (1978). Thyroxine 5'-deiodinase activity of rat kidney: observations on activation by thiols and inhibition by propylthiouracil. *Endocrinology*, 103 (6), 2137-2144.
173. Leonard J.L., Visser T.J. (1986). Biochemistry of deiodination. In: Hennemann G, ed. *Thyroid hormone metabolism*, New York: Marcel Dekker Inc, 189-229.
174. Li J., Liang Y., Mao H., Deng W., Zhang J. (2014). Effects of B-lymphocyte dysfunction on the serum copper, selenium and zinc levels of rheumatoid arthritis patients. *Pak J Med Sci*, 30(5), 1064-1067.
175. Lin H.Y., Sun M., Tang H.Y., Lin C., Luidens M.K., Mousa S.A., Incerpi S., Drusano G.L., Davis F.B., Davis P.J. (2009). L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(5), C980-C991.
176. Liu W.K., Tsui K.W., Wong C.C. (1993). Repressed activity of peritoneal macrophages in methimazole-induced hypothyroid mice. *Virchows Archiv B Cell Pathol*, 63(2), 131-136.
177. Lizcano F., Salvador J. (2008). Effects of different treatments for hyperthyroidism on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35(9), 1085-90.

178. Lobo P.I. (2016). Role of natural autoantibodies and natural IgM anti-leucocyte autoantibodies in health and disease. *Front Immunol*, 7, 198.
179. Ma S.F., Xie L., Pino-Yanes M., Sammani S., Wade M.S., Letsiou E., Siegler J., Wang T., Infusino G., Kittles R.A., Flores C., Zhou T., Prabhakar B.S., Moreno-Vinasco L., Jacobson J.R., Dudek S.M., Garcia J.G.N. (2011). Type 2 Deiodinase and Host Responses of Sepsis and Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45(6), 1203–1211.
180. Maia A.L., Kim B.W., Huang S.A., Harney J.W., Larsen P.R. (2005). Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest*, 115(9), 2524–2533.
181. Mariani E., Ravaglia G., Forti P., Meneghetti A., Tarozzi A., Maioli F., Boschi F., Pratelli L., Pizzoferrato A., Piras F., Facchini A. (1999). Vitamin D, thyroid hormones and muscle mass influence natural killer (NK) innate immunity in healthy nonagenarians and centenarians. *Clinical and Experimental Immunology*, 116(1), 19-27.
182. Marsh J.A., Combs G.F., Whitacre M.E., Dietert R.R. (1986). Effect of selenium and vitamin E dietary deficiencies on chick lymphoid organ development. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 182 (4), 425-436.
183. Marsh J.A., Dietert R.R., Combs G.F. Jr. (1981). Influence of dietary selenium and vitamin E on the humoral immune response of the chick. *Proc Soc Exp Biol Med*, 166(2), 228-36.
184. Marsili A., Tang D., Harney J.W., Singh P., Zavacki A.M., Dentice M., Salvatore D., Larsen P.R. (2011). Type II iodothyronine deiodinase provides intracellular 3,5,3'-triiodothyronine to normal and regenerating mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301(5), E818-24.
185. Martinazzi M., Giraldi M. (1962). Hemopoiesis in the mouse with pituitary dwarfism. *Bolletino della Societa italiana di biologia sperimentale*, 38, 116-8.
186. Mattmiller S.A., Carlson B.A., Gandya J.C., Sordillo L.M. (2014). Reduced macrophage selenoprotein expression alters oxidized lipid metabolite biosynthesis from arachidonic and linoleic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25(6), 647–654.
187. McCord J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 108(8), 652–9.
188. 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.
189. Mellado M., Fernández-Agulló T., Rodríguez-Frade J.M., San Frutos M.G., de la Peña P., Martínez-A.C., Montoya E. (1999). Expression analysis of the

- thyrotropin-releasing hormone receptor (TRHR) in the immune system using agonist anti-TRHR monoclonal antibodies. *FEBS Lett*, 451(3), 308–314.
190. Melnicoff M.J., Horan P.K., Morahan P.S. (1989). Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation. *Cell Immunol*, 118 (1), 178–191.
  191. Milanović S. (2012). Uticaj propiltiouracila i jopanoične kiseline na funkciju tireoidne osovine i aktivnost glutation peroksidaza kod selen-deficijentnih i selen-adekvatnih juvenilnih pacova, Doktorska teza, Univerzitet u Beogradu.
  192. Mitić K., Miletić T., Kovačević-Jovanović V., Kuštrimović N., Kosec D., Dimitrijević M., Stanojević S. (2010). Phenotype changes induced by immunization with encephalitogen affected the functions of peritoneal macrophages in two rat strains with different sensitivity to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induction. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 60 (2-3), 105-121.
  193. Mittag J., Behrends T., Hoefig C.S., Vennstrom B., Schomburg L. (2010). Thyroid hormones regulate selenoprotein expression and selenium status in mice. *PLoS One*, 5:e12931.
  194. Molinero P., Osuna C., Guerrero J.M. (1995). Type II thyroxine 5'-deiodinase in the rat thymus. *J Endocrinol*, 146(1), 105-11.
  195. Montagne J.J., Ladram A., Nicolas P., Bulant M. (1999). Cloning of thyrotropin-releasing hormone precursor and receptor in rat thymus, adrenal gland, and testis. *Endocrinology* 140 (3), 1054–1059.
  196. Montecino-Rodriguez E., Clark R., Johnson A., Collins L., Dorshkind K. (1996). Defective B cell development in Snell dwarf (dw/dw) mice can be corrected by thyroxine treatment.. *J Immunol*, 157(8), 3334-40.
  197. Montecino-Rodriguez E, Clark R.G., Powell-Braxton L., Dorshkind K. (1997). Primary B cell development is impaired in mice with defects of the pituitary/thyroid axis. *J Immunol* 159, 2712–2719.
  198. Morel F., Doussiere J., Vignais P.V. (1991). The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem*, 201(3), 523-546.
  199. Mulhern S.A., Taylor B.S.G.L., Magruder B.S.L.E., Vessey A.R. (1985). Deficient levels of dietary selenium suppress the antibody response in First and second generation mice. *Nutrition Research*, 5(2), 201-210.
  200. Nair M.P.N., Schwartz S.A. (1990). Immunoregulation of natural and lymphokine-activated killer cells by selenium. *Immunopharmacology*, 19 (3), 177-183.
  201. Nakamura R., Teshima R., Hachisuka A., Sato Y., Takagi K., Nakamura R., Woo G.H., Shibutani M., Sawada J.I. (2007). Effects of developmental hypothyroidism induced by maternal administration of methimazole or

- propylthiouracil on the immune system of rats. *International Immunopharmacology*, 7(13), 1630–1638.
202. Naper C., Shegarfi H., Inngjerdingen M., Rolstad B. (2011). The role of natural killer cells in the defense against *Listeria monocytogenes*. Lessons from a rat model. *J Innate Immun*, 3(3), 289-97.
  203. Nathan C.F., Root R.K. (1977). Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. *J Exp Med*, 146(6), 1648-62.
  204. Nelson D.S., Boyden S.V. (1963). The loss of macrophages from peritoneal exudates following the injection of antigen into guinea pigs with delayed-type hypersensitivity. *Immunol*, 6 (3), 264-275.
  205. Nelson H.K., Shi Q., Van Dael P., Schiffrin E.J., Blum S., Barclay D., Levander O.A., Beck M.A. (2001). Host nutritional selenium status as a driving force for influenza virus mutations. *FASEB J*, 15(10), 1846-8.
  206. Nelson S.M., Lei X., Prabhu K.S. (2011). Selenium Levels Affect the IL-4–Induced Expression of Alternative Activation Markers in Murine Macrophages. *Nutr* 141(9), 1754–1761.
  207. Nguyen T.T., Chapa F., DiStefano J.J. 3rd (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(11), 4626-33.
  208. Norton R.L., Hoffmann P.R. (2012). Selenium and asthma. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(1), 98–106.
  209. Oez S., Welte K., Platzer E., Kalden JR. (1990). A simple assay for quantifying the inducible adherence of neutrophils. *Immunobiology*, 180(4-5), 308-15.
  210. O'Shea J., Ortaldo J.R. (1992). The biology of natural killer cells: insights into the molecular basis of function. In: Lewis CE, McGee JO, eds. *The natural immune system. The natural killer cell*. Oxford, United Kingdom: IRL Press, 2–40.
  211. Ochsenbein A.F., Zinkernagel R.M. (2000).. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity, *Review, Immunology Today*, 21 (12), 624-30.
  212. Oh S.H., Lee M.H., Chung C.J. (1982), Protection of phagocytic macrophages from peroxidative damage by selenium and vitamin E. *Yonsei medical Journal*, 23(2), 101-9.
  213. Ohashi H., Itoh M. (1994). Effects of thyroid hormones on the lymphocyte phenotypes in rats: changes in lymphocyte subsets related to thyroid function. *Endocr Regul*, 28(3), 117-23.



214. Ongele E.A., Ashraf M., Nebitt R.A., Humphrey P.A., Lee C.M. (2000). Effects of selenium deficiency in the development of trypanosomes and humoral immune responses in mice infected with *Trypanosoma musculi*. *Parasitol Res* 88 (6), 540–545.
215. Oppenheimer J.H., Schwartz H.L., Surks M.I. (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(9), 2493–2497.
216. Pacini F., Nakamura H., DeGroot L.J. (1983). Effect of hypo- and hyperthyroidism on the balance between helper and suppressor T cells in rats. *Acta endocrinologica*, 103(4), 528-534.
217. Palmblad J., Adamson U., Rosenqvist U., Uden A.M., Venizelos N. (1981). Neutrophil Function in Hypothyroid Patients.. *Acta Med Scand* 210 (4), 287-291.
218. Papp L.V., Lu J., Holmgren A., Khanna K.K. (2007). From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(7), 775-806.
219. Parnham M.J., Winkelmann J., Leyck S. (1983). Macrophage, lymphocyte and chronic inflammatory responses in selenium deficient rodents. Association with decreased glutathione peroxidase activity. *Int J Immunopharmac*, 5(5), 455-461.
220. Paschke R., Geenen V. (1995). Messenger RNA expression for a TSH receptor in the thymus of a two- ear-old child. *J Mol Med*, 73, 577-580.
221. Pawlikowski M., Stepien H., Komorowski J. (1994). Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis and the immune system. *Neuroimmunomodulation*, 1(3), 149-152.
222. Paynter D.I. (1979). Glutathione peroxidase and selenium in sheep. 1. Effect of intraruminal selenium pellets on tissue glutathione peroxidase activities. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30(4), 695-702.
223. Peeters R.P., Visser T.J. (2017). Metabolism of Thyroid Hormone, Editors In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors *Source Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-2017 Jan 1
224. Pemberton P.W., Ahmad Y., Bodill H., Lokko D., Hider SL, Yates AP, Walker MG, Laing I., Bruce IN (2009). Biomarkers of oxidant stress, insulin sensitivity and endothelial activation in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study of their association with accelerated atherosclerosis. *BMC Res Notes*, 2, 83.

225. Peng X., Cui H., Fang J., Zuo Z., Deng J., Pan K., Lai W., Zhou Y. (2012). Low selenium diet alters cell cycle phase, apoptotic population and modifies oxidative stress markers of spleens in broilers. *Biol Trace Elem Res*, 148(2), 182-6.
226. Peng X., Cui Y., Cui W., Deng J., Cui H., Yang F. (2011). The cell cycle arrest and apoptosis of bursa of fabricius induced by low selenium in chickens. *Biol Trace Elem Res*, 139(1), 32-40.
227. Pereira B, Costa Rosa L.F.B.P., Safi D.A., Bechara E.J.H, Curi R. (1995), Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages, *Biochem Pharmacol*, 50(12), 2093-98.
228. Perrotta C., Buldorini M., Assi E., Cazzato D., De Palma C., Clementi E., Cervia D. (2014). The Thyroid Hormone Triiodothyronine Controls Macrophage Maturation and Functions Protective Role during Inflammation. *Am J Pathol*, 184(1), 230-47.
229. Pick E., Mizel D. (1981). Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*, 46(2), 211-26.
230. Pick E., Keisari Y. (1981). Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages-induction by multiple nonphagocytic stimuli. *Cellular Immunology*, 59(2), 301-18.
231. Pierpaoli W., Baroni C., Fabris N., Sorkin E. (1969). Hormones and the immunological capacity. II. Reconstitution of antibody production in hormonally deficient mice by somatotropic hormone, thyrotropic hormone and thyroxin. *Immunology* 16 (2), 217-30.
232. Poffenbarger E.M., Klausner J.S., Miller W.J. (1989). Natural killer cell function in the selenium deficient rat. *Nutrition research*, 9 (5), 581-584.
233. Provinciali M., Fabris N. (1991). Models and mechanisms of neuroendocrine-immune interactions during ontogeny. *Advances in Neuroimmunology* 1(2), 124-138.
234. Provinciali M., Di Stefano T.G., Fabris N. (1992). Improvement in the proliferative capacity and Natural Killer cell activity of murine spleen lymphocytes by Thyrotropin. *Int J Immunopharmac*, 14 (5), 865-870.
235. Provinciali M., Muzzioli M., Fabris N. (1987). Thyroxine-dependent modulation of natural killer activity. *J Exp Pathol*, 3(4), 617-22.
236. Provinciali M., Muzzioli M., Di Stefano G., Fabris N. (1991). Recovery of spleen cell natural killer activity by thyroid hormone treatment in old mice. *Nat Immun Cell Growth Regul* 10(4), 226-36.

237. Provinciali M., Fabris N. (1990). Modulation of lymphoid cell sensitivity to interferon by thyroid hormones. *J Endocrin Invest*, 13(2), 187-191.
238. Raiden S., Polack E., Nahmod V., Labeur I.M., Holsboer F., Arzt E. (1995). TRH Receptor on Immune Cells: In Vitro and in Vivo Stimulation of Human Lymphocyte and Rat Splenocyte DNA Synthesis by TRH. *Journal of Clinical Immunology*, 15(5), 242-9.
239. Ravaglia G., Forti P., Maioli F., Bastagli L., Facchini A., Mariani E., Savarino L., Sassi S., Cucinotta D., Lenaz G. (2000). Effect of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects aged  $\geq 90$  y. *Am J Clin Nutr*, 71(2): 590-598.
240. Reffett J.K., Spears J.W., Brown T.T. Jr. (1988a). Effect of Dietary Selenium on the Primary and Secondary Immune Response in Calves Challenged with Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus, *J Nutr*. 118(2), 229-235
241. Reffett J.K., Spears J.W., Brown T.T. Jr. (1988b). Effect of dietary selenium and vitamin E on the primary and secondary immune response in lambs challenged with parainfluenza 3 virus. *J Anim Sci*, 66(6), 1520-8
242. Reilly C. (2013). *Selenium in Food and Health*. Springer Science & Business Media, 2<sup>nd</sup> ed, Brisbane, Australia, p.194
243. Renko K., Hoefig C.S., Hiller F., Schomburg L., Köhrle J. (2012). Identification of Iopanoic Acid as Substrate of Type 1 Deiodinase by a Novel Nonradioactive Iodide-Release Assay. *Endocrinology* 153: 2506–2513.
244. Robinson J.M., Badwey J.A., Karnovsky M.L., Karnovsky M.J. (1985). Release of superoxide and change in morphology by neutrophils in response to phorbol esters: antagonism by inhibitors of calcium-binding proteins. *J Cell Biol*, 101(3), 1052–1058.
245. Roebuck K.A., Finnegan A. (1999). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol*, 66(6), 876–88.
246. Roksandić D., Radovanović A., Danilović Luković J., Marković D., Kovačević Filipović M., Čolić M. (2015). Stereological and Immunohistochemical Study of the Spleen in Hypothyroid Juvenile Rats. *Acta Veterinaria*, 65 (2), 246–259.
247. Rooke J.A., Robinson J.J., Arthur J.R. (2004). Effects of vitamin E and selenium on the performance and immune status of ewes and lambs. *The Journal of Agricultural Science* 142(3), 253 – 262.
248. Rooney A.A., Fournier M., Bernier J., Cyr D.G. (2003). Neonatal exposure to propylthiouracil induces a shift in lymphoid cell sub-populations in the developing postnatal male rat spleen and thymus. *Cell Immunol*, 223(2), 91-102.

249. Rooney A.A., Matulka R.A., Luebke R.W. (2003a). Developmental Atrazine Exposure Suppresses Immune Function in Male, but not Female Sprague-Dawley Rats. *Toxicological Sciences*, 76(2), 366–375.
250. Roos D., Wiening R.S., Wyss S.R., Aebi H.E. (1980). Protection of human neutrophils by endogenous catalase. *J Clin Invest*, 65 (6), 1515-22.
251. Rossi F., Zatti M. (1964). Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia*, 20 (1): 21–23.
252. Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G., Hoekstra W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179 (4073), 588–590.
253. Roy M., Kiremidjian-Schumacher L., Wishe H.I., Cohen M.W., Stotzky G. (1993). Selenium supplementation enhances the expression of interleukin 2 receptor subunits and internalization of interleukin 2. *Proc Soc Exp Biol Med*, 202(3), 295–301.
254. Roy M., Kiremidjian-Schumacher L., Wishe H.I., Cohen M.W., Stotzky G. (1994). Supplementation with selenium and human immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and interleukin 2 receptor expression. *Biol Trace Elem Res*, 41 (1-2), 103–14.
255. Safir N., Wendel A., Saile R., Chabraoui L. (2003). The Effect of Selenium on Immune Functions of J774.1 Cells. *Clin Chem Lab Med*, 41(8), 1005–1011.
256. Salvatore D., Bartha T., Harney J.W., Larsen P.R. (1996). Molecular, biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology* 137(8), 3308–3315.
257. Savino W., Wolf B., Aratan-Spire S., Dardenne M. (1984). Thymic hormone containing cells. IV. Fluctuations in the thyroid hormone levels in vivo can modulate the secretion of thymulin by the epithelial cells of young mouse thymus. *Clinical and Experimental Immunology* 55, 629–635.
258. Schomburg L., Riese C., Michaelis M., Griebert E., Klein M.O., Sapin R., Schweizer U., Köhrle J. (2006). Synthesis and Metabolism of Thyroid Hormones Is Preferentially Maintained in Selenium-Deficient Transgenic Mice. *Endocrinology*, 147(3), 1306–1313.
259. Schwartz K., Foltz S.M. (1957). Se as an integral part of factor 3 against necrotic liver degeneration, *J. Mountain Chemical Society*; 79, 3292-3.
260. Schwartz-Albiez R., Monteiro R.C., Rodriguez M., Binder C.J.Y., Shoenfeld Y. (2009). Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clin Exp Immunol*, 158 (Suppl 1), 43–50.

261. Segal J., Ingbar S.H. (1982). Specific Binding Sites for Triiodothyronine in the Plasma Membrane of Rat Thymocytes: correlation with biochemical responses, *Journal of Clinical Investigation*. 70(5), 919–926.
262. Segura J.J., Guerrero J.M., Pozo D., Calvo J.R. (1996). Expression of vasoactive intestinal peptide binding sites in rat peritoneal macrophages is stimulated by inflammatory stimulus. *Journal of Neuroimmunology* 64(1), 1–7.
263. Selvarajan K., Moldovan L., Chandrakala A.N., Litvinov D., Parthasarathy S. (2011). Peritoneal macrophages are distinct from monocytes and adherent macrophages. *Atherosclerosis*, 219(2), 475-83.
264. Serfass R.E., Ganther H.E. (1976). Effects of dietary selenium and tocopherol in glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in rat phagocytes. *Life Sci*, 19(8), 1139-1 144.
265. Serhan C.N., Ward P.A., Gilroy D.W. (2010). *Fundamentals of inflammation*, Cambridge University Press, New York, USA.
266. Sharma S.D., Tsai V., Proffitt M.R. (1982). Enhancement of Mouse Natural Killer Cell Activity by Thyroxine. *Cellular Immunology* 73(1), 83-97.
267. Sheffy B.E., Schultz R.D. (1978). Influence of vitamin E and selenium on immune response mechanisms. *Cornell Vet.* 68 (Suppl. 7), 89-93.
268. Shen J., Devery J.M., King N.J.C. (1995). Adherence status regulates the primary cellular activation responses to the flavivirus West Nile. *Immunology*, 84, 254-264.
269. Shrimali R.K., Irons R.D., Carlson B.A., Sano Y., Gladyshev V.N., Park J.M., Hatfield D.L. (2008). Selenoproteins Mediate T Cell Immunity through an Antioxidant Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (29), 20181–20185.
270. Silva J.E., Larsen P.R. (1986). Hormonal regulation of iodothyronine 5'-deiodinase in rat brown adipose tissue, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 251 (6), E639-E643.
271. Smith A.D., Botero S., Shea-Donohue T., Urban J.F. Jr (2011). The Pathogenicity of an Enteric *Citrobacter rodentium* Infection Is Enhanced by Deficiencies in the Antioxidants Selenium and Vitamin E. *Infection and Immunity*, 79(4), 1471–1478.
272. Smith E.M., Phan M., Kruger T.E., Copenhaver D.H., Blalock J.E. (1983). Human lymphocyte production of immunoreactive thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 80, 6010–6013.
273. Spallholz J.E., Boylan E. (1989). Effect of dietary selenium on peritoneal macrophage chemiluminescence. *Federation J.* 3:A778.

274. Spallholz J.E., Martin J.L., Gerlach M.L., Heinzerling R.H. (1973a). Immunologic Responses of Mice Fed Diets Supplemented with Selenite Selenium. *Proc Soc Exp Med Biol*, 143 (3), 685-689.
275. Spallholz J.E., Martin J.L., Gerlach M.L., Heinzerling R.H. (1973b). Enhanced Immunoglobulin M and Immunoglobulin G Antibody Titers in Mice Fed Selenium. *Infection and Immunity*, 8(5), 841-842.
276. Splettstoesser W.D., Schuff-Werner P. (2002). Oxidative Stress in Phagocytes—"The Enemy Within" *Microsc Res Tech* 57(6), 441-455.
277. Sporn S.A., Eierman D.F., Johnson C.E. (1990). Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. *J Immunol* 144(11), 4434-41.
278. Sprague A.H., Khalil R.A. (2009). Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease. *Biochem Pharmacol*, 78(6), 539-552
279. St. Germain D.L. (1988a). 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.
280. St. Germain D.L. (1988b). 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.
281. Stýblo M., Walton F.S., Harmon A.W., Sheridan P.A., Beck M.A. (2007). Activation of superoxide dismutase in selenium-deficient mice infected with influenza virus. *J Trace Elem Med Biol*, 21(1), 52-62.
282. Stabel J.R., Nonnecke B.J., Reinhardt T.A. (1990). Effect of in vitro selenium repletion on bovine lymphocyte proliferation. *Nutrition Research*, 10 (9), 1053-1059.
283. Stanojević S., Ćuruvija I., Blagojević V., Petrović R., Vujić V., Dimitrijević M. (2016). Strain-dependent response to stimulation in middle-aged rat macrophages: a quest after a useful indicator of healthy aging. *Experimental Gerontology*, 85, 95-107.
284. Stanojević S., Mitić K., Vujić V., Kovačević-Jovanović V., Dimitrijević M. (2007). The influence of stress and methionine-enkephalin on macrophage functions in two inbred rat strains. *Life Sciences* 80, 901-909.
285. Steinsapir J., Bianco A.C., Buettner C., Harney J., Larsen P.R. (2000). Substrate-induced down-regulation of human type 2 deiodinase (hD2) is mediated through proteasomal degradation and requires interaction with the enzyme's active center. *Endocrinology*, 141(3), 1127-35.

286. Stein-Streilein J., Zakarija M., Papic M., McKenzie J.M. (1987). Hyperthyroxinemic mice have reduced natural killer cell activity. Evidence for a defective trigger mechanism. *J Immunol* 139, 2502-2507.
287. Stout R.D., Suttles J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*, 76, 509-13.
288. Suckow M.A. (2005). *The Laboratory Rat*. Academic Press, p. 848.
289. Sun Y., Lu X., Gershengorn M.C. (2003). Thyrotropin-releasing hormone receptors-similarities and differences. *J Mol Endocrinol*, 30(2), 87–97.
290. Swann J.B., Hayakawa Y., Zerafa N., Sheehan K.C.F., Scott B., Schreiber R.D., Hertzog P., Smyth M.J. (2007). Type I IFN Contributes to NK Cell Homeostasis, Activation, and Antitumor Function. *Journal of Immunology*, 178 (12), 7540-7549.
291. Tak P.P., Firestein G.S. (2001). NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, 107(1), 7–11.
292. Talcott P.A., Exon J.H., Koller L.D. (1984). Alteration of natural killer cell-mediated cytotoxicity in rats treated with selenium, diethylnitrosamine and ethylnitrosourea. *Cancer Letters*, 23 (3), 313-322.
293. Tarp U., Overvad K., Hansen J.C., Thorling E.B. (1985). Low selenium level in severe rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 14, 97-101.
294. Toulis K.A., Anastasilakis A.D., Tzellos T.G., Goulis D.G., Kouvelas D. (2010). Selenium supplementation in the treatment of Hashimoto's thyroiditis: a systematic review and a metaanalysis. *Thyroid*, 20, 1163–1173.
295. Trivanović D., Mojsilović S., Ilić V., Krstić J., Jauković A., Okić-Đorđević I., Santibanez J.F., Jovčić G., Bugarski D. (2013). Immunomodulatory capacity of human mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue, dental pulp, peripheral blood and umbilical cord, Wharton's Jelly, *Central European Journal of Immunology*, 38, 421-429.
296. Turner R.J., Finch J.M. (1991). Selenium and the immune response. *Proceedings of the Nutrition Society* 50, 275-285.
297. Ueno H., Hasegawa G., Ido R., Okuno T., Nakamuro K. (2008). Effects of selenium status and supplementary seleno-chemical sources on mouse T-cell mitogenesis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 22, 9–16.
298. van der Weerd K., van Hagen P.M., Schrijver B., Heuvelmans S.J.W.M., Hofland L.J., Swagemakers S.M.A., Bogers A.J.C.C., Dik W.A, Visser T.J, van Dongen J.J.M., van der Lelij A-J, Staal F.J.T. (2014). Thyrotropin Acts as a T-Cell Developmental Factor in Mice and Humans. *Thyroid*, 24 (6), 1051-1061.

299. Vanderpas J.B., Contempré B., Duale N.L., Goossens W., Bebe N., Thorpe R., Ntambue K., Dumont J., Thilly C.H., Diplock A.T. (1990). Iodine and selenium deficiency associated with cretinism in northern Zaire. *Am J Clin Nutr*, 52(6), 1087-93.
300. van Doorn J.D., 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.
301. Vega L., Rodríguez-Sosa M., García-Montalvo E.A., Del Razo L.M., Elizondo G. (2007). Non-optimal levels of dietary selenomethionine alter splenocyte response and modify oxidative stress markers in female mice. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1147–1153.
302. Veronikis I.E., Braverman L.E., Alex S., Fang S.L., Norvell B., Emerson C.H. (1996). Comparison of the effects of propylthiouracil and selenium deficiency on T3 production in the rat. *Endocrinology*, 137(6), 2580-5.
303. Villa-Verde D.M., de Mello-Coelho V., Farias-de-Oliveira D.A., Dardenne M., Savino W. (1993). Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. *Endocrinology* 133, 867–875.
304. Villa-Verde D.M.S., Defresne M.P., Vannier-Dos-Santos M.A., Dussault I.H., Boniver I., Savino W. (1992). Identification of nuclear triiodothyronine receptors in the thymic epithelium. *Endocrinology*, 131(3), 1313-1320.
305. Visser T.J., Leonard J.L., Kaplan M.M., Larsen P.R. (1982). Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(16), 5080–5084.
306. Visser T.J. (1994). Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chem Biol Interact*, 92(1-3), 293-303.
307. Visser T.J. (1996). Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta Med Austriaca*, 23(1-2), 10-6.
308. Volpé R. (2001). The Immunomodulatory Effects of Anti-thyroid Drugs are Mediated via Actions on Thyroid Cells, Affecting Thyrocyte-immunocyte Signalling: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 7, 451-460.
309. Vunta H., Belda B.J., Arner R.J., Reddy C.C., Vanden Heuvel J.P., Prabhu K.S. (2008). Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages. *Mol Nutr Food Res*, 52(11), 1316 – 1323.
310. Vunta H., Davis F., Palempalli U.D., Bhat D., Arner R.J., Thompson J.T., Peterson D.G., Reddy C.C., Prabhu K.S. (2007). The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages. *J Biol Chem*, 282(25), 17964–17973.



311. Wagner M.S., Morimoto R., Dora J.M., Benneman A., Pavan R., Maia A.L. (2003). Hypothyroidism induces type 2 iodothyronine deiodinase expression in mouse heart and testis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 31(3), 541–550.
312. Wang C., Wang H., Luo J., Hu Y., Wei L., Duan M., He H. (2009). Selenium deficiency impairs host innate immune response and induces susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *BMC Immunology*, 10:55.
313. Wang Y., Wang H., Zhan X. (2016). Effects of different dl-selenomethionine and sodium selenite levels on growth performance, immune functions and serum thyroid hormones concentrations in broilers. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 100, 431–439.
314. Watanabe K., Iwatani Y. (1995). Long-Term Effects of Thyroid Hormone on Lymphocyte Subsets in Spleens and Thymuses of Mice. *Endocrine Journal*, 42(5), 661-668.
315. Westholm D.E., Stenehjem D.D., Rumbley J.N., Drewes L.R., Anderson G.W. (2009). Competitive inhibition of organic anion transporting polypeptide 1c1-mediated thyroxine transport by the fenamate class of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Endocrinology*, 150(2), 1025–1032.
316. Wheeler M.L., DeFranco A.L. (2012). Prolonged production of reactive oxygen species in response to BCR stimulation promotes B cell activation and proliferation. *J Immunol* 189(9), 4405–4416.
317. Wilson R., Mckillop J.H., Chopra M., Thomson J.A. (1988). The effect of antithyroid drugs on B and T cell activity in vitro *Clinical Endocrinology*. 28(4), 389-397.
318. Wittmann G., Harney J.W., Singru P.S., Nouriel S.S., Larsen P.P., Lechan R.M. (2014). Inflammation-Inducible Type 2 Deiodinase Expression in the Leptomeninges, Choroid Plexus, and at Brain Blood Vessels in Male Rodents. *Endocrinology* 155, 2009–2019.
319. Yang Z., Liu C., Liu C., Teng X., Li S. (2016). Selenium Deficiency Mainly Influences Antioxidant Selenoproteins Expression in Broiler Immune Organs. *Biological Trace Element Research*, 172 (1), 209-221.
320. Yao Y., Pei F., Kang P. (2011). Selenium, iodine, and the relation with Kashin-Beck disease. *Nutrition*, 27(11-12), 1095-1100
321. Yen P.M., Ando S., Feng X., Liu Y., Maruvada P., Xia X. (2006). Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol* 246, 121–127.
322. Yen P.M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81, 1097–1142.

323. Yona S., Jung S. (2010). Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol*, 17(1), 53-59.
324. Yu L., Sun L., Nan Y., Zhu L.Y. (2011). Protection from H1N1 Influenza Virus Infections in Mice by Supplementation with Selenium: A Comparison with Selenium-Deficient Mice. *Biological Trace Element Research*, 141 (1), 254–261.
325. Yu T.K., Caudell E.G., Smid C., Grimm E.A. (2000). IL-2 Activation of NK Cells: Involvement of MKK1/2/ERK But Not p38 Kinase Pathway. *J Immunol*, 164(12), 6244-6251.
326. Zamamiri-Davis F., Lu Y., Thompson J.T., Prabhu K.S., Reddy P.V., Sordillo L.M., Reddy C.C. (2002). Nuclear factor-kappaB mediates over-expression of cyclooxygenase-2 during activation of RAW 264.7 macrophages in selenium deficiency. *Free Radic Biol Med*, 32(9), 890–7.
327. Zhang F., Yu W., Hargrove J.L., Greenspan P., Dean R.G., Taylor E.W., Hartle D.K. (2002). Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. *Atherosclerosis*, 161(2), 381-6.

## 9. СКРАЋЕНИЦЕ

AA	арахидонска киселина
COX	циклооксигеназа
D1-3	јодотиронин дејодиназа 1-3
GPx	глутатион пероксидаза
IA	јопаноична киселина
IFN	интерферон
IL	интерлеукин
LOX	липооксигеназа
NF-κB	нуклеарни фактор капа Б
PG	простагландин
PMA	форбол миристат ацетат
PTU	пропилтиоурацил
ROS	реактивне врсте кисеоника
SeCys	селеноцистеин
SRBC	овчији еритроцити
T3	тријодтиронин
T4	тироксин
TNF	тумор некротични фактор
TR	тиреоидни рецептор
TRH	тиреолиберин
TrxR	тиоредоксин редуктаза
TSH	тиреостимулирајући хормон

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Јелена Бјелица рођена је 29.03.1976. године у Шапцу, Република Србија. Основну школу и гимназију завршила је у Шапцу. Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду уписала је школске 1994./1995. године, а дипломирала у децембру 2002. године са просечном оценом 9,45.

Докторске студије уписала је школске 2006/2007. године на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду, на катедри за Физиологију и биохемију, и положила све испите са просечном оценом 9,93.

Од јануара 2003.-2004 године запослена је у компанији ZorkaPharma Шабац, затим од 2004-2005 у Немовет-у, Београд, у оквиру компаније Немофарм, Вршац. Од септембра 2005. до данас запослена је у Агенцији за лекове и медицинска средства Републике Србије, на пословима процене квалитета, безбедности и ефикасности ветеринарских имунолошких лекова и безбедности и ефикасности хемофармацеутика у поступку добијања дозволе за стављање лека у промет.

Похађала је стручне скупове и конгресе из области регулативе и ветеринарске вакцинологије. Учествује у сарадњи са Европском агенцијом за лекове (ЕМА) у оквиру ИРА пројекта ЕУ, као представник Агенције за лекове Србије на радној групи за ветеринарске имунолошке лекове.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Бјелица

број уписа 14/3

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај дефицита селена и блокатора дејодиназа на

урођени и стечени имунски одговор јувенилних пацова“

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.08.2017.

Ј. Бјелица

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Бјелица

Број уписа 14/3

Студијски програм Докторске академске студије

Наслов рада „Утицај дефицита селена и блокатора дејодиназа на урођени и стечени имунски одговор јувенилних пацова“

Ментор Проф Др Иван Б. Јовановић

Потписана Јелена Бјелица

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.08.2017.

  
\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

„Утицај дефицита селена и блокатора дејодиназа на урођени и стечени имунски одговор 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, 28.08.2017.

