

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marko Š. Miler

**UTICAJ CITRUSNIH FLAVANONA NA
TIROIDNU HOMEOSTAZU I LIPIDNI
STATUS STARIH PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marko Š. Miler

**IMPACT OF CITRUS FLAVANONES ON
THYROID HOMEOSTASIS AND LIPID
STATUS OF OLD-AGED RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTORI

dr Branka Šošić-Jurjević, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Nebojša Jasnić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA

dr Branka Šošić-Jurjević, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Nebojša Jasnić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Verica Milošević, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za citologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Odgovor neuroendokrinog sistema pacova na odabrane biljne ekstrakte, fitoestrogene, steroidne i peptidne hormone“ (broj 173009), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvalnica

Imam prijatnu dužnost da, u trenucima kada se moja doktorska disertacija sprema da izađe na svetlost dana, pomenem sve one koji su mi pomogli u njenoj izradi.

Dr Branki Šošić-Jurjević, mojoj Mentorki, dugujem veliku zahvalanost na svemu što me je naučila i podstakla da sam naučim tokom dosadašnje naučne karijere, na većitom preispitivanju kao jedinom putu intelektualnog usavršavanja, na iscrpnim diskusijama koje smo vodili i imperativu težnje ka najboljem koju mi je usadila.

Dr Nebojši Jasniću iskreno zahvaljujem na podršci, te konstruktivnim i dragocenim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove disertacije.

Dr Verici Milošević, mom Rukovodiocu, izražavam neizmernu zahvalnost na pažnji i vremenu koje je posvetila svim etapama izrade moje doktorske disertacije, na ukazanom poverenju, na osloncu koji sam u njoj imao, razumevanju i njenoj nepokolebljivoj veri u kvalitet i domete mog naučnog rada. Čast mi je, privilegija i zadovoljstvo što sam deo njenog naučno-istraživačkog tima.

Dr Jasmini Živanović i **dr Ivani Jarić**, veliko hvala što su me naučile prve naučne korake, na plodonosnoj intelektualnoj razmeni, na bezgraničnom strpljenju i brizi, na dobroj atmosferi tokom svih eksperimenata koje smo izvodili, na smehu, a posebno na prijateljstvu.

Dr Vladimiru Ajdžanoviću, zahvaljujem na beskompromisnoj podršci, na produktivnim naučnim razgovorima, na pravom usmerenju u svakom trenutku, na vanvremenskim filmskim replikama, iskrenom osmehu i prijateljstvu.

Dragim kolegama **dr Branku Filipoviću**, **dr Milici Manojlović Stojanoski**, **dr Nataši Nestorović**, **dr Svetlani Trifunović** i **dr Nataši Ristić** zahvalan sam na dugogodišnjoj korektnoj saradnji, prijatnim razgovorima, naučnim i van-naučnim diskusijama, kao i nesebičnoj profesionalnoj pomoći koju su mi uvek pružali.

Dr Draganu Milenkoviću, cenjenom kolegi i izuzetnom saradniku, veoma sam zahvalan na svojoj praktičnoj i intelektualnoj pomoći koju mi je nesebično pružio tokom izrade ove doktorske disertacije

Dr Dušku Blagojeviću, **dr Aleksandri Nikolić-Kokić**, **dr Zorani Oreščanin-Dušić**, **dr Ani Mijušković** i **Nikoli Tataloviću** hvala na velikoj pomoći tokom dobijanja i tumačenja dela rezultata i što su me prihvatili i prigrlili kao svog.

Dr Sanji Stanković zahvaljujem na efikasnoj pomoći i konstruktivnim sugestijama tokom dobijanja dela rezultata.

Dr Mariji Glibetić, dr Aleksandri Konić-Ristić, dr Neveni Kardum i Filipu Stojanoviću najtoplije zahvaljujem na gostoprimstvu koje su mi ukazali tokom gostovanja u njihovoj laboratoriji i praktičnoj pomoći tokom izvođenja dela eksperimentalnog rada.

Dr sci. med. Tamari Kravić, dr Tamari Martinović i dipl. ing. Draganu Beševiću, kolegama iz Centra za elektronsku mikroskopiju, Institut za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić”, Medicinski fakultet u Beogradu, zahvaljujem na prilici koju su mi pružili za rad u Centru, te angažovanju i profesionalnoj pomoći pri izradi elektronskih mikrografija visokog estetskog nivoa.

Dragim kolegama sa **Odeljenja za imunologiju i Odeljenja za biohemiju** dugujem zahvalnost na strpljenju, pomoći i sugestijama tokom izvođenja eksperimentalnih procedura, kao i prijatnim razgovorima koje smo tim prilikama vodili.

Anji, Ljupki, Sofiji, Sanji, Sonji, Mikiju, Dragani i Bokiju, mojim kolegama i prijateljima, hvala na osmehu, toploj reči, na inspirativnim razgovorima u bašti i kantini, kao i na svim divnim trenucima koje smo proživeli.

Ernestu, Maji, Snežani, Aci, Ivani, Vesni, Ini, Slađani, Vladi, Nenadu hvala što su imali strpljenja za mene i moje obaveze koje su znale da se ispreče, ali ne i da prekinu divno prijateljstvo koje negujemo godinama i zbog kojeg nikad nisam sam.

Mojoj porodici, **mami, tati** i sestri **Maji,** dugujem zahvalnost za neograničenu ljubav koju su mi pružili, za konstantnu podršku koja mi je bila oslonac, za veru u mene i moje izbore, na vaspitanju, na tome što su u mene utkali svoje najbolje osobine i načela, a koji su me učinili boljim čovekom.

Uticaj citrusnih flavanona na tiroidnu homeostazu i lipidni status starih pacova

Sažetak

Citrusni flavanoni, naringenin (NAR) i hesperetin (HES), su polifenolne supstance koje zbog sterne sličnosti sa endogenim tiroksinom (T_4) mogu da interferiraju sa aktivnošću tiroidne peroksidaze, ključnog enzima u biosintezi tiroidnih hormona. Sa starenjem se povećava osetljivost tiroidne osovine na efekte egzogenih supstanci i raste rizik od nastanka hroničnih bolesti usled opadanja detoksikacione sposobnosti i akumulacije lipida u jetri. Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita uticaj NAR i HES na tiroidnu homeostazu i lipidni status 24 meseca starih mužjaka pacova Wistar soja. Supstance su aplikovane *per os* u dozi od 15 mg/kg t.m., tokom četiri nedelje. Rezultati ove disertacije su pokazali da NAR i HES uzrokuju strukturne i ultrastrukturne promene štitaste žlezde starih mužjaka pacova, povećavaju imunohistohemijsku ekspresiju tiroglobulina za koji je vezan T_4 i vaskularnog endotelijalnog faktora rasta. Ekspresija trijodtironinom (T_3) regulisanih gena u jetri je snižena nakon tretmana citrusnim flavanonima. U serumu, NAR je povisio koncentracije TSH i HDL, dok je koncentracija antioksidativnih enzima jetre snižena nakon oba tretmana. Uočava se desaturacija masnih kiselina u fosfolipidima membrane hepatocita, povećanje udela n-3, a sniženja zastupljenosti n-6 masnih kiselina nakon primene oba citrusna flavanona. Smanjuje se lipidna peroksidacija membrane hepatocita i poboljšava antioksidativna zaštita u jetri nakon NAR i HES tretmana. NAR je ispolji jači efekat, jer je uticao na aktivnost, gensku i proteinsku ekspresiju antioksidativnih enzima, i parametre redoks ravnoteže, dok je HES pojačao antioksidativnu zaštitu, ali u manjoj meri. Upotreba citrusnih flavanona uzrokuje neželjene efekte - subkličničku hipotireozu koju prate povišen nivo TSH i smanjena ekspresija T_3 regulisanih gena u jetri. Međutim, sa stanovišta desaturacije membrane hepatocita i poboljšanja antioksidativne zaštite u jetri, upotreba NAR i HES se može smatrati korisnom, imajući u vidu uticaj ovih promena na produženje dužine životnog veka.

Ključne reči: Citrusni flavnoni, naringenin, hesperetin, štitasta žlezda, tiroidna homeostaza, jetra, lipidni status, masnokiselinski profil fosfolipida, antioksidativna zaštita, stari Wistar pacovi

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Eksperimentalna biomedicina

Impact of citrus flavanones on thyroid homeostasis and lipid status of old-aged rats

Abstract

Citrus flavanones, naringenin (NAR) and hesperetin (HES), are polyphenolic substances, structurally similar to endogenous thyroxine (T₄), that can interfere with the activity of thyroid peroxidase, the key enzyme in thyroid hormone biosynthesis. With aging, thyroid axis sensitivity to the effects of exogenously applied substances increases and the risk of chronic diseases raises due to reduced detoxification ability and the accumulation of lipids in the liver. The aim of this doctoral dissertation was to examine the impact of NAR and HES on thyroid homeostasis and the lipid status of 24 months-old Wistar male rats. The substances were administered *per os* at a dose of 15 mg/kg b.w., for four weeks. The results of this dissertation have shown that NAR and HES cause structural and ultrastructural changes in the thyroid gland of old male rats, increasing the immunohistochemical expression of T₄ bounded to thyroglobulin as well as of vascular endothelial growth factor. Expression of triiodothyronine (T₃) regulated genes in the liver were decreased after treatment with citrus flavanones. In the serum, the NAR increased concentrations of TSH and HDL, while the concentration of liver antioxidative enzymes was reduced after both treatments. The desaturation of fatty acids in the hepatocyte membrane phospholipids, the increase in the proportion of n-3, and the reduction in the presence of n-6 fatty acids after application of both citrus flavanones is observed. Lipid peroxidation of the hepatocyte membrane is reduced and the antioxidant protection is improved in the liver after NAR and HES treatments. The NAR has a stronger effect, as it has affected the activity, gene and protein expression of antioxidant enzymes, as well as the parameters of redox balance, while HES enhanced antioxidant protection, but to a less degree. The use of citrus flavanones causes unwanted effects - subclinical hypothyroidism followed by elevated TSH and reduced expression of T₃ regulated genes in the liver. However, from the perspective of the hepatocyte membrane desaturation and the enhancement of antioxidant protection in the liver, the use of NAR and HES can be considered useful, given that the effects of these changes are associated with the extend life span.

Key words: Citrus flavanones, naringenin, hesperetin, thyroid gland, thyroid homeostasis, liver, lipid status, phospholipid fatty acid profile, antioxidant defence, old-aged Wistar rats

Research area: Biology

Area of special interest: Experimental biomedicine

Lista skraćenica

- ALT – alanin aminotransferaza
AOE – antioksidativni enzimi
AST – aspartat aminotransferaza
CAT – katalaza
DAB – eng. *diaminobenzidine tetrahydrochloride*
DHA – dokozaheksaenoinska kiselina
Dio 1 – dejodinaza tip 1
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
ELISA - eng. *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
EPA – eikozapentaenoinska kiselina
GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GGT – gama-glutamil transpeptidaza
GPx – glutation peroksidaza
GR – glutation reduktaza
GSH – glutation
GSSG – oksidovani glutation
H₂O₂ – vodonik peroksid
HDL – lipoprotein velike gustine
HES – hesperetin
HOL – ukupni holesterol
HPRT – hipoksantin fosforiboziltransferaza
HRP - peroksidaza poreklom iz rena (eng. *Horse Radish Peroxidase*)
IF – imunofluorescentno
IHH – imunohistohemijski
LDL – lipoprotein male gustine
LXR – jetreni X receptor (eng. *liver X receptor*)
MDA – malonildialdehid
MUFA – mononezasićene masne kiseline
NAR – naringenin
NIS – natrijum-jodidni kotransporter
O²⁻ - superoksid anjon radikal

PBS - fosfatom puferisan fiziološki rastvor (eng. *Phosphate Buffered Saline*)
PCR - reakcija lančanog umnožavanja (eng. *Polymerase Chain Reaction*)
PUFA – polinezasićene masne kiseline
RIF – relativni intenzitet fluorescence
RNK – ribonukleinska kiselina
ROS – reaktivne vrste kiseonika
RXR - retinoid X receptor (eng. *retinoid X receptor*)
SDS-PAGE - natrijum-dodecilsulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
SFA – zasićene masne kiseline
SH grupe – sulfhidrilne grupe
SOD1 – superoksid dismutaza 1
SOD2 – superoksid dismutaza 2
T₃ – trijodtironin
T₄ – tiroksin
T₄-Tg – T₄ vezan za Tg
TBA – tiobarbituratna kiselina
TBARS – reaktivne vrste tiobarbiturine kiseline
Tg – tiroglobulin
TG – ukupni trigliceridi
TH – tiroidni hormoni
Thrsp – *thyroid hormone responsive spot114 protein*
TR – tiroidni receptor
TSH – tirostimulirajući hormon
VEGF – vaskularni endotelijalni faktor rasta

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Štitasta žlezda.....	1
1.1.1. Struktura štitaste žlezde.....	1
1.1.2. Morfološka i funkcionalna heterogenost folikula.....	2
1.1.3. Čelije folikuskog epitela	4
1.2. Biosinteza, sekrecija i transport tiroidnih hormona.....	5
1.2.1. Biosinteza tiroidnih hormona	5
1.2.2. Sekrecija tiroidnih hormona	7
1.2.3. Transport tiroidnih hormona	8
1.2.3.1. Aktivni transport tiroidnih hormona.....	8
1.2.3.2. Transport tiroidnih hormona u krvi.....	9
1.3. Molekularni mehanizam delovanja tiroidnih hormona	10
1.3.1. Enzimi dejodinaze	10
1.3.2. Tiroidni receptori.....	13
1.4. Delovanje tiroidnih hormona na lipidni metabolizam u jetri	16
1.5. Koncept zdravog starenja	19
1.5.1. Starenje i funkcija štitaste žlezde	20
1.6. Struktura i funkcija jetre.....	24
1.6.1. Morfološke i funkcionalne promene u jetri sa starenjem	25
1.6.2. Reaktivne vrste kiseonika i antioksidativna zaštita u jetri.....	26
1.6.3. Starenje i antioksidativni enzimi u jetri.....	29
1.7. Polifenoli i citrusni flavanoni.....	30
1.7.1. Biološka dejstva polifenola i citrusnih flavanona	31
1.7.1.1. Potencijalno štetna biološka dejstva – uticaj na endokrinu homeostazu.....	31
1.7.1.2. Polifenoli kao endokrini ometači	33
1.7.1.3. Uticaj citrusnih flavanona na tiroidnu homeostazu	34
1.7.1.4. Antioksidativna aktivnost citrusnih flavanona	35
2. CILJEVI.....	38
3. MATERIJAL I METODE.....	39
3.1. Eksperimentalne životinje	39
3.2. Tretmani životinja	39
3.3. Izolovanje organa i priprema seruma	40
3.4. Priprema uzoraka za histološku i ultrastrukturnu analizu	40
3.4.1. Priprema za histološku analizu.....	40
3.4.2. Hematoksilin eozin bojenje	40
3.4.3. Masson trihromatsko bojenje	41

3.4.4.	Imunohistohemijsko i imunofluorescentno bojenje	41
3.4.5.	Priprema za ultrastrukturnu analizu	43
3.4.6.	Stereološka analiza štitaste žlezde.....	44
3.4.6.1.	Određivanje apsolutnog volumena.....	44
3.4.6.2.	Određivanje relativne volumenske gustine histoloških faza	45
3.4.7.	Određivanje relativne volumenske gustine epitela imunopozitivnog na Na ⁺ /I ⁻ kotransporter.....	45
3.4.8.	Kvantitativna analiza imunofluorescentnog signala tiroksina vezanog za tiroglobulin	46
3.5.	Izolacija RNK, reverzna transkripcija i reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.....	46
3.5.1.	Izolacija RNK.....	46
3.5.2.	Reverzna transkripcija.....	47
3.5.3.	Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu	47
3.6.	Analiza koncentracije hormona u krvnom serumu.....	50
3.6.1.	Određivanje koncentracije ukupnog tiroksina u krvnom serumu.....	50
3.6.2.	Određivanje koncentracije tirostimulirajućeg hormona u krvnom serumu	50
3.7.	Analiza biohemijskih parametra u krvnom serumu.....	51
3.7.1.	Određivanje koncentracije alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze i γ-glutamilttransferaze u krvnom serumu	51
3.7.2.	Određivanje koncentracije holesterola u krvnom serumu	51
3.7.3.	Određivanje koncentracije triglicerida u krvnom serumu	52
3.8.	Analiza profila masnih kiselina u fosfolipidima membrane hepatocita jetre	53
3.8.1.	Izolacija ukupnih lipida jetre.....	53
3.8.2.	Razdvajanje lipidnih klasa tankoslojnom hromatografijom.....	53
3.8.3.	Metilovanje masnih kiselina.....	54
3.8.4.	Analiza masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom	54
3.9.	Izolacija ukupnih proteina i Western blot analiza	55
3.9.1.	Izolacija ukupnih proteina jetre.....	55
3.9.2.	Elektroforeza proteina	55
3.9.3.	Imunoblot	56
3.10.	Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima	57
3.10.1.	Priprema uzoraka za određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima	57
3.10.2.	Određivanje aktivnosti ukupne superoksid dismutaze	57
3.10.3.	Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza 1 i 2.....	58
3.10.4.	Određivanje aktivnosti katalaze	58
3.10.5.	Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze.....	59
3.10.6.	Određivanje aktivnosti glutation reduktaze.....	59
3.11.	Određivanje koncentracije glutationa.....	60

3.11.1.	Određivanje koncentracije ukupnog glutationa.....	60
3.11.2.	Određivanje koncentracije oksidovanog glutationa	61
3.12.	Određivanje koncentracije ukupnih tiolnih grupa	61
3.13.	Određivanje koncentracije reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline.....	61
3.14.	Statistička analiza.....	62
4.	REZULTATI.....	63
4.1.	Telesna masa, apsolutna i relativna masa organa.....	63
4.2.	Strukturna i funkcionalna karakterizacija štitaste žlezde starih mužjaka pacova.....	65
4.2.1.	Kvalitativno-histološke karakteristike štitaste žlezde starih mužjaka pacova.....	65
4.2.2.	Kvalitativno-histološke karakteristike štitaste žlezde starih mužjaka pacova nakon tretmana citrusnim flavanonima	67
4.2.3.	Stereološke karakteristike štitaste žlezde starih mužjaka pacova.....	69
4.2.4.	Stereološke karakteristike štitaste žlezde nakon tretmana citrusnim flavanonima..	71
4.3.	Ultrastrukturalna analiza štitaste žlezde.....	73
4.4.	Funkcionalno-morfološka karakterizacija štitaste žlezde starih mužjaka pacova	78
4.5.	Koncentracija tirostimulirajućeg hormona i ukupnog tiroksina u serumu	89
4.6.	Uticaj citrusnih flavanona na relativnu koncentraciju iRNK gena regulisanih trijodtironinom u jetri starih pacova.....	90
4.7.	Biohemijski parametri u serumu pacova tretiranih citrusnim flavanonima	92
4.8.	Histološke karakteristike jetri starih pacova tretiranih citrusnim flavanonima.....	93
4.9.	Koncentracija enzima jetre u serumu	95
4.10.	Masnokiselinski profil fosfolipida membrane hepatocita u jetri pacova tretiranih citrusnim flavanonima	97
4.11.	Koncentracija reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline u jetri starih pacova	100
4.12.	Parametri antioksidativnog statusa u jetri pacova tretiranih citrusnim flavanonima...	101
4.12.1.	Aktivnost antioksidativnih enzima	101
4.12.2.	Analiza relativne genske ekspresije antioksidativnih enzima	103
4.12.3.	Analiza relativne proteinske ekspresije antioksidativnih enzima.....	105
4.13.	Parametri redoks ravnoteže	107
5.	DISKUSIJA.....	109
6.	ZAKLJUČCI.....	122
7.	LITERATURA.....	124

1. UVOD

1.1. Štitasta žlezda

1.1.1. Struktura štitaste žlezde

Štitasta žlezda sisara lokalizovana je iza tiroidne hrskavice larinksa i čine je dva lobusa povezana tkivnim mostom, istmusom. Žlezdu okružuje kapsula od rastresitog vezivnog tkiva i od nje polaze vezivne septe koje zalaze u unutrašnjost žlezde. Osnovna funkcija štitaste žlezde je sinteza i sekrecija tiroidnih hormona (TH). Štitasta žlezda je jedina endokrina žlezda sačinjena iz folikula, koji predstavljaju strukturnu i funkcionalnu jedinicu žlezde. Folikuli su sferičnog oblika i morfološki se razlikuju. Zid folikula sastoji se iz kontinuiranog, jednoslojnog epitela koji može da bude niskoprizmatičan, kuboidalan i visokoprizmatičan (Wissig, 1960). Stimulacija tirostimulirajućim hormonom (TSH) uzrokuje povećanje visine epitela koji postaje kuboidalan ili visokoprizmatičan, a dolazi i do povećanja resorpcije koloida, te smanjenja veličine lumena folikula. Koloid predstavlja mešavinu proteina, uglavnom tiroglobulina (Tg), ali prisutni su i jodirani proteini male molekulske mase, kao i frakcije tiroidnog albumina (Smeds, 1972).

Pored folikulskih ćelija, endotelske ćelije kapilara koje okružuju folikule neophodne su za održavanje arhitekture tkiva štitaste žlezde. Anatomski, endokrine i endotelske ćelije su lokalizovane veoma blisko, što stvara jedinstvenu interaktivnu sredinu koja omogućava brzu adaptaciju žlezde. Ova struktura sačinjena od folikula okruženih fenestriranim krvnim kapilarima naziva se angiofolikulska jedinica (AFJ) i predstavlja morfo-funkcionalnu jedinicu žlezde (Gérard i sar., 2015; Colin i sar., 2013; Šošić-Jurjević i sar., 2015).

Kapilarna mreža pokriva 20-50% površine folikula (Colin i sar., 2010, 2015). Ova komunikacija je važna jer omogućava brzi transport hormona u cirkulaciju i njihovu distribuciju do ciljnih tkiva i organa. Takođe, obezbeđuje se brza reakcija endokrinih ćelija na promenljivo snabdevanje jodom i potrebe organizma za TH. Pored toga, kapilarna mreža obezbeđuje da nutrijenti i signalni molekuli neophodni za preživljavanje stignu do žlezde ili da se uklone štetni produkti.

Pored folikulskih ćelija, u štitastoj žlezdi pacova prisutne su i C ćelije, pojedinačno ili u grupama, koje nisu u direktnom kontaktu s lumenom folikula. One sekretuju kalcitonin kao odgovor na povećanu koncentraciju kalcijuma u serumu. Pored kalcitonina, C ćelije luče somatostatin, grelin, 5-hidroksi triptamin, peptid sličan gastrinu i druge hormone.

Intersticijum (stromu) štitaste žlezde čine limfni sudovi, kolagena vlakna, fibroblasti i nervna vlakna. Lateralno, na obodima lobusa štitaste žlezde se nalaze paraštitaste žlezde, parni organi odvojeni od folikulskog tkiva posebnom kapsulom. Čelije ove žlezde proizvode paratiroidni hormon koji zajedno sa kalcitoninom reguliše kontroliše promet i koncentraciju kalcijuma i fosfora u organizmu (Kronenberg, 2016).

1.1.2. Morfološka i funkcionalna heterogenost folikula

AFJ ne funkcionišu kao uniformna (jedinstvena populacija), već kao heterogena grupa različitih jedinica. Glavna karakteristika štitaste žlezde je heterogenost folikula koja se može uočiti na morfološkom i funkcionalnom nivou. Morfološki, folikuli parenhima štitaste žlezde razlikuju se po veličini (dijametri), visini folikulskog epitela, količini i obojenosti koloida (Wollman, 1980). Folikuli malih dimenzija su obično lokalizovani u centralnom delu žlezde i čine njenu aktivnu zonu. Morfološki su prepoznatljivi po kuboidealnom ili cilindričnom epitelu i maloj količini koloida. Stimulacija jodom i TSH izaziva brzu reakciju, te inkorporiraju velike količine joda u lumen folikula. Nasuprot njima, folikuli većih dimenzija, tzv. makrofolikuli, pretežno su lokalizovani periferno. Karakterišu se nižim folikulskim epitelom i proširenim lumenom. Makrofolikuli uopšte ne reaguju ili reaguju na stimulus (jod i TSH) tek nakon 1-2 sata. Oni čine hipofunkcionalnu zonu žlezde (Penel i sar., 1982, 1985).

Funkcionalno, potvrđeno je da se sekrecija TH odvija prvenstveno iz novosintetisanog pula hormona, dakle iz aktivne zone, u skladu sa „*last come, first served*“ konceptom funkcionisanja štitaste žlezde (Schneider, 1964). Hipofunkcionalni folikuli karakterišu se prisustvom nerastvornih tetramerskih globula Tg (Gérard i sar., 2004). Takođe, ovi autori su pokazali da u štitastoj žlezdi pored interfolikulska heterogenosti postoji i intrafolikulska heterogenost, tj. da nisu svi tirociti unutar jednog folikula jednako aktivni u sintezi TH, što je takođe potvrdila imunohistohemijska analiza Gérard i saradnika (2002).

Tiroidni kapilari su u bliskoj vezi s funkcionalnim statusom folikula od kojih zavise. Uočava se korelacija stepena aktivnosti folikula sa proširenjem mikrocirkulacije oko njega, koja je veća oko aktivnih, nego oko neaktivnih folikula (Colin i sar., 2010, 2013). Funkcionalna karakterizacija tkiva humanih, pacovskih i mišjih štitastih žlezda imunohistohemijskom metodom pokazala je da je u mikrofolikulima izrazitija

ekspresija pendrina (eng. *pendred syndrome gene product*; PDS), natrijum-jodidnog kotransportera (eng. *sodium-iodide symporter*, NIS), tiroidne peroksidaze (eng. *thyroid peroxidase*; TPO) i dual oksidaza (eng. *dual oxidase*; DUOX), u odnosu na makrofolikule. U lumenu malih folikula takođe je identifikovana jaka imunopozitivnost tiroksina (T_4) vezanog za tiroglobulin (T_4 -Tg), markera funkcionalnog statusa štitaste žlezde (Faggiano i sar., 2004). Ova analiza predstavlja dobar eksperimentalni pristup za utvrđivanje razlika u funkcionalnoj aktivnosti između folikula i procenu aktivnosti štitaste žlezde u sintezi TH (Gérard i sar., 2003, 2004).

Održavanje integriteta vaskularne mreže u štitastoj žlezdi regulisano je vaskularnim endotelskim faktorom rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), proteinom koji se eksprimira u folikulskim ćelijama štitaste žlezde (Wang i sar., 1998). One proizvode VEGF kao odgovor na TSH stimulaciju, čime se promoviše fenestracija i povećava vaskularna permeabilnost AFJ. U slučaju strume, u kojoj je TSH visok, primećena je visoka ekspresija VEGF, dok hemijska blokada produkcije VEGF ublažava posledice stimulacije TSH (Cao, 2014). Gérard i sar. (2002) su pokazali da tirociti takođe ekspimiraju azot oksid sintazu III (eng. *nitric oxide synthase III*; NOS III) i da postoji pozitivna korelacija između ekspresije ovog faktora i lokalne ekspanzije mikrocirkulacije. Neaktivni folikuli su manje vaskularizovani od aktivnih i karakteriše ih gubitak ekspresije vaskularnih regulatora. Ovo ukazuje da su vaskularni faktori uključeni u regulaciju AFJ kod miševa i ljudi (Gérard i sar., 2004; Colin i sar., 2010). Morfološka i funkcionalna heterogenost koja se uočava u štitastoj žlezdi može se smatrati adaptivnim odgovorom na različite fiziološke uslove.

Najvažniji faktori u kontroli sinteze i sekrecije TH su jod i TSH (Dohan i sar., 2003; Dunn i sar., 1983). Nedovoljne količine joda uzrokuju neadekvatnu sintezu TH, povećanje sekrecije TSH i stimulaciju rasta žlezde (strumu) kao pokušaj da se kompenzuje ovaj nedostatak. Sa druge strane, prevelika koncentracija joda inhibira sintezu TH (Wolff-Chaikoff efekat), tako što blokira generisanje vodonik peroksida (H_2O_2) i jodinaciju Tg (Wolff i Chaikoff, 1948). TSH ima uticaj na skoro sve korake u sintezi i sekreciji TH: stimuliše ekspresiju NIS, TPO, Tg i generisanje H_2O_2 , povećava stvaranje trijodtironina (T_3) u odnosu na T_4 , menja prioritet jodinacije i hormonogeneze u tirozinskim ostacima i utiče na brzu internalizaciju Tg u tirocite (Dunn i sar., 1983; Kogai i sar., 1997; Lin i sar., 2004; Rousset i sar., 2015).

1.1.3. Čelije folikulskog epitela

Tirociti, čelije folikulskog epitela štitaste žlezde su polarizovane: bazalni pol je okrenut ka krvnim kapilarima, a apikalni pol ka lumenu folikula. Čelijske organele imaju polarnu organizaciju što omogućava pravilnu sintezu TH i transport joda, jer se specifični membranski proteini eksprimiraju na njihovom bazalnom (NIS) ili apikalnom polu (PDS), obezbeđujući vektorski transport joda do koloida (Ericson i Nilsson, 1992). Čelije folikulskog epitela su povezane čvrstim vezama (lat. *zonula occludens*). Pred njih, prisutne su tesne veze (eng. *tight junction*), kao i dezomezomi, a pukotinaste veze omogućavaju prolaz malih molekula kroz zajednički kanal između tirocita.

Bazalno, ćelija je okrenuta prema krvnim kapilarima od kojih je odvojena bazalnom laminom. Na ovom polu tirocita pozicionirano je jedro. Bazolateralno je pozicioniran TSH receptor (TSH-R) i NIS. Aktivni transport Na^+ uz kotransport I^- iz cirkulacije u tirocite vrši transporter NIS, dok PDS procesom pasivne difuzije transportuje I^- iz citoplazme u lumen folikula.

Sve komponente sintetskog aparata tirocita TPO, DUOX, Tg, kao I^- i H_2O_2 nalaze se na apikalnoj membrani tirocita, gde se odvija celokupan proces biosinteze TH. Ova strana apikalne membrane okrenuta je ka lumenu folikula i prekrivena je mikrovilima i pseudopodijama. U citoplazmi u neposrednoj blizini apikalne membrane uočavaju se male kapi resorbovanog koloida, koji se usvaja procesom makropinocitoze. Ovaj proces podrazumeva formiranje pseudopodija koje okružuju deo koloida i njegovo usvajanje u ćeliju.

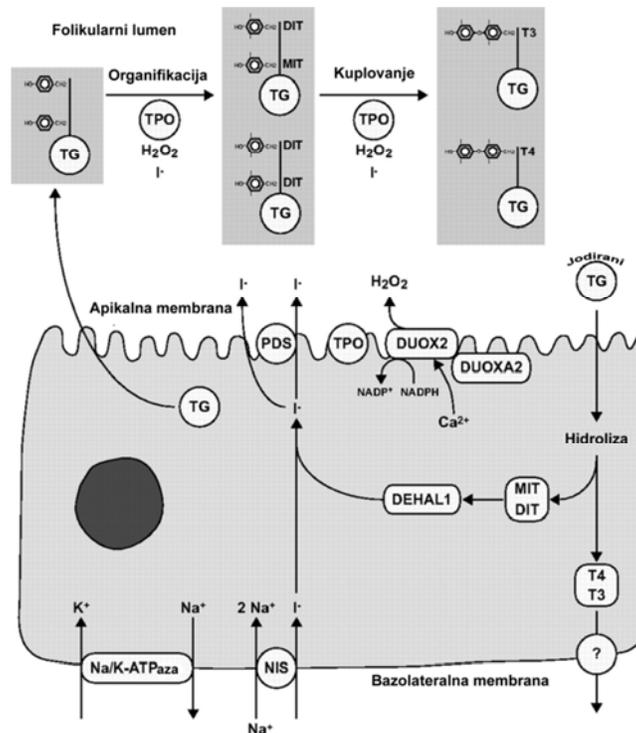
Od ostalih organela, u citoplazmi se uočavaju brojne štapićaste mitohondrije. Takođe, tirociti imaju dobro razvijen granulirani endoplazmatični retikulum (gER) i Goldži aparat. U zavisnosti od sekretorne aktivnosti, prisutni su lizozomi različitog oblika. Lizozomi se spajaju sa koloidnim kapima, i nakon proteolize Tg, TH se oslobađaju u cirkulaciju aktivnim transportom.

1.2. Biosinteza, sekrecija i transport tiroidnih hormona

1.2.1. Biosinteza tiroidnih hormona

Štitasta žlezda proizvodi dva hormona, T_4 i u manjoj meri T_3 . Usvajanje joda iz cirkulacije u ćelije folikularnog epitela je esencijalan korak za sintezu TH. Na bazolateralnoj membrani tirociti ekspresira se NIS kotransporter, koji obezbeđuje aktivan transport $2Na^+$ i $1I^-$ u tirociti, nasuprot njihovom elektrohemijjskom gradijentu (Slika 1.1). Energija za održavanje gradijenta Na^+ obezbeđuje se aktivnošću enzima Na^+K^+ -ATPaze (Bizhanova i Kopp, 2009). I^- potom iz citoplazme pasivnim transportom kroz apikalnu membranu tirociti prelazi u koloid, a ceo proces je posredovan Cl^-/I^- jonskim izmenjivačem pendrinom (Yoshida i sar., 2004). Pored PDS, transport I^- u lumen folikula se obavlja novootkrivenim proteinom nazvanim anoktamin 1 (Iosco i sar., 2014; Mondal i sar., 2016). Štitasta žlezda je u stanju da koncentruje jod tako da koncentracija u žlezdi bude 20 do 50 puta viša od njegove koncentracije u plazmi (Berson 1955; Chung, 2014).

Celokupan proces biosinteze tiroidnih hormona odvija se na apikalnoj membrani epitela folikularnih ćelija štitaste žlezde. Nakon transporta joda dolazi do njegovog oksidovanja u jodid (I_2) aktivnošću enzima TPO i njegove organifikacije, kovalentnog vezivanja za tirozinske aminokiselinske ostatke (Dunn i Dunn, 2001). Na ovaj način se formiraju monojodtirozin (MIT) i dijodtirozin (DIT). Kuplovanjem dva susedna DIT formira se T_4 , a jedan DIT i jedan MIT formiraju T_3 (Slika 1.1).



Slika 1.1 Biosinteza i sekrecija tiroidnih hormona (preuzeto i prilagođeno iz Bizhanova i Kopp, 2009). Na^+/K^+ -ATPaza; NIS, natrijum-jodidni kotransporter; PDS, pendrin; TG, tiroglobulin; TPO, tiroidna peroksidaza; DUOX2, dual oksidaza 2; MIT, monojodtirozin; DIT, dijodtirozin; DEHAL1, jodtirozin dehalogenaza; T_4 , tiroksin; T_3 , trijodtironin.

Aktivnost TPO je isključivo ograničena na apikalni deo membrane tirocita (Kotani i Ohtaki, 1987; Fayadat i sar., 1998). Kao i svaka peroksidaza, TPO zahteva H_2O_2 za proces oksidacije, a enzimski kompleks koji generiše H_2O_2 je DUOX, membranski NADPH-zavisna flavanoprotein oksidaza. Ovi enzimi su kolokalizovani s TPO na apikalnoj membrani tirocita (De Deken i sar., 2000), a DUOX2 je dominantna forma koja generiše H_2O_2 u tirocitima (Ameziane-El-Hassani i sar., 2016).

Tg je najzastupljeniji protein u štitastoj žlezdi (>95%) i njegova glavna funkcija je da obezbedi polipeptidnu osnovu/lanac za sintezu i skladištenje TH (Dunn i Dunn, 2000). Ovaj protein sintetiše se u ćelijama folikularnog epitela, odakle se sekretuje u lumen folikula. Funkcionalni Tg je prisutan u formi dimera molekulske mase 660 kDa, sedimentacione konstante 19S. U koloidu se takođe nalaze Tg, ali i manji polipeptidi koji su nastali degradacijom monomera i dimera. Kovalentnim unakrsnim vezivanjem dimera Tg nastaju nesolubilne tetramerske globule Tg (27S), koje su uglavnom lokalizovane u centralnom delu koloida i služe kao rezerva prohormona zbog visokog

sadržaja jodotirozina. Ova rezerva se rastvara nakon TSH stimulacije ili nedovoljne koncentracije joda (Herzog i sar., 1992). Suprotno tome, jodiranje i hormonogeneza unutar novosintetisanih, solubilnih molekula Tg, koji su lokalizovani u neposrednoj blizini apikalne membrane tirocita, čini ih dostupnim za brzo preuzimanje od strane folikuskog epitela za sekreciju TH, u skladu sa „*last come, first served*“ konceptom (Schneider, 1964).

1.2.2. Sekrecija tiroidnih hormona

Tiroidni folikuli generišu slobodne hormone preuzmanjem Tg iz koloida, njegovim transportom do lizozoma u kojima dolazi do hidrolize peptidnih veza Tg i oslobađanja T₄ i T₃. Bazalna internalizacija Tg je posredovana endocitozom ili mikropinocitozom vezikula u kojima se nalazi Tg.

Prilikom TSH stimulacije dolazi do mikropinocitoze, pri čemu se Tg internalizuje, odnosno usvaja od strane tirocita (Bernier-Valentin i sar., 1990). Pseudopodije predstavljaju produžetke apikalne membrane koji se projektuju u lumen folikula. One se odvajaju od membrane kako bi formirale koloidne kapi. Pseudopodije se potom fuzionišu sa lizozomima u kojima se odigrava proces degradacije Tg. Formiranje pseudopodija predstavlja najraniji znak stimulacije TSH, koje su prisutne nekoliko minuta nakon stimulacije (Barriere i sar., 1986).

Internalizovani molekuli Tg u lizozomima podležu hidrolitičkim reakcijama koje dovode do generisanja slobodnih TH, recikliranja MIT i DIT i kompletne degradacije Tg proteina. Tg predstavlja supstrat za mnoge enzime lizozoma: proteaze, glikohidrolaze, fofsataze, sulfataze itd. Endopeptidaze kao što su katepsin D, H i L su sposobne da razgrade Tg molekul (Dunn i sar., 1991a, 1991; Dunn i sar., 1996). Nakon Tg digestije, T₄ i T₃ napuštaju lizosome i dospevaju u citoplazmu, a iz citoplazme aktivnim transportom u cirkulaciju.

Oko 70% joda iz Tg je u formi MIT i DIT tako da oni predstavljaju značajan pul unutarćelijskog izvora joda (Rousset i sar., 2015; Hildebrandt i sar., 1979). Kako ne bi izgubila jod, žlezda dejodinizuje MIT i DIT delovanjem enzima jodotironin dehalogenaza (Slika 1.1) i vraća većinu oslobođenog joda u koloid (Gnidehou i sar., 2004; Bobyk i sar., 2015). U proseku 3-5x više joda se dnevno formira procesom dejodinacije u žlezdi nego usvajanjem iz seruma (De Groot, 1966; Mondal i sar., 2016).

1.2.3. Transport tiroidnih hormona

1.2.3.1. Aktivni transport tiroidnih hormona

Sve do 1970. godine, smatralo se da se transport TH kroz plazma membranu ciljnih ćelija odvija procesom pasivne difuzije. Međutim, savremeni eksperimentalni podaci (Visser i sar., 2007) potvrđuju da je u pitanju aktivni (kontrolisani) transport, koji se vrši posredstvom različitih transportera. U transportere TH spadaju: monokarboksilatni proteini (eng. *monocarboxylate transporter*, MCT), L-tip transportera aminokiselina (eng. *L-type amino acid transporters*, LAT), organski anjonski transportni polipeptidi (eng. *organic anion-transporting polypeptide*, OATP) i natrijum/tauroholat kotransporterski polipeptid (eng. *sodium/taurocholate cotransporter protein*, NTCP) (Bernal i sar., 2015). Transport TH je predmet intenzivnih istraživanja i značaj specifične ekspresije ovih proteinskih transportera u različitim tkivima ukazuje na dodatnu, tkivno-specifičnu regulaciju njihove prisutnosti i biološke aktivnosti.

MCT proteini transportuju monokarboksilatne kiseline (piruvat, laktat), ketonska tela, karnitin i aromatične aminokiseline. Dva člana ove familije, MCT8 i MCT10 su natrijum i proton-nezavisni TH transporteri. MCT8 je specifičan transporter T_4 i T_3 , ali i rT_3 i T_2 (Bernal i sar., 2015), a eksprimira se u jetri, bubrezima, srcu, placenti, mozgu i hipofizi (Halestrap, 2012). MCT8 je visoko eksprimiran u folikulskom epitelu štitaste žlezde (Wirth i sar., 2011; di Cosmo i sar., 2010) a njegova bazolateralna lokalizacija sugeriše da je uključen u efluks TH (Müller i Heuer, 2012). Zaista, di Cosmo i sar. (2010) su pokazali da miševi kod kojih postoji nefunkcionalan MCT8 transporter, imaju nižu koncentraciju TH u serumu. Međutim, nije još potvrđeno da li još neki od transportera učestvuje u sekreciji TH.

MCT10 (T-tip transportera aminokiselina) je, pored T_3 i T_4 , specifičan transporter aromatičnih aminokiselina. Eksprimira se u crevima, bubrezima, jetri, skeletnim mišićima, srcu, placenti, neuronima kako postnatalnih, tako i adultnih miševa (Meredith i Christian, 2008). U poređenju s MCT8, MCT10 je efikasniji u transportu T_3 u odnosu na T_4 (Friesema i sar., 2008).

LAT su natrijum-nezavisni transporteri koji zajedno s aminokiselinama transportuju T_4 i T_3 . LAT1 usvajaju sve jodotironine, ali sa jasnom preferencijom prema T_2 i rT_3 . LAT2 posreduje u usvajanju T_3 i T_2 , a oba transportera učestvuju u procesu usvajanja MIT. LAT3 i LAT4 posreduju efluksu T_2 i MIT iz ćelije (Visser, 2016). LAT1 i LAT2 se

ekspimiraju u mozgu i prisutni su u endotelskim ćelijama mozga miša u razvoju (Bernal i sar., 2015). LAT3 se ekspimiraju u jetri i pankreasu (Babu i sar., 2003), a LAT4 u bubrezima, crevima mozgu i placenti (Bodoy i sar., 2005).

Član OATP familije, OATP1C1 posreduje u transportu amfipatičnih organskih jedinjenja, ali poseduje afinitet prema T_4 i T_3 (Roth i sar., 2012; Pizzagalli i sar., 2002). Transporter se ekspimiraju u oligodendrocitima, endotelskim ćelijama i mikrogliji (Bernal i sar., 2015). Ntcp je zadužen za enterohepatičku cirkulaciju žučnih kiselina. Član je familije solute carrier gena 10A, a transportuje derivate sulfata T_4 i T_3 u jetru radi dejodinacije (Bernal i sar., 2015).

Pored ovih transportera, pokazano je da translokaza masnih kiselina (eng. *fatty acid translocase*, FAT ili CD36) posreduje u usvajanju T_3 i drugih jodotironina u srcu (van der Putten i sar., 2003).

1.2.3.2. Transport tiroidnih hormona u krvi

U cirkulaciji, glavna frakcija TH je vezana za transportne proteine (ukupni TH), dok su slobodni (nevezani), biološki aktivni TH prisutni u veoma niskim koncentracijama u krvi. Kod ljudi, glavni transportni protein TH u serumu je tiroksin-vezujući protein (eng. *thyroxine binding globuline*, TBG), a ovu funkciju takođe imaju transtiretin (eng. *transthyretin*, TTR), jedini transportni protein TH u cerebrospinalnoj tečnosti, i albumin (Refetoff, 2000). Nekoliko drugih proteina serumu, pogotovo lipoproteini male gustine (eng. *low density lipoproteins*, LDL) takođe vezuju T_4 i T_3 (Benvenga i Robbins, 1998). TBG ima najveći afinitet a najslabiji kapacitet za vezivanje T_4 , albumin najveći afinitet a najslabiji kapacitet, dok TTR ima srednje jak kapacitet kao i afinitet (Köhrle 2000).

TBG poseduje jedno jodotironinsko mesto koje vezuje T_4 većim afinitetom nego T_3 . Poluživot mu je 5 dana, a eliminiše se u jetri. Sa starenjem dolazi do povećanja njegove koncentracije u serumu (Braverman i sar., 1966). Steroidni hormoni, estrogeni i androgeni utiču na koncentraciju TGB u krvi i na taj način indirektno mogu uticati na nivo TH (Bisschop i sar., 2006).

TTR je glavni transportni protein TH u krvi glodara (Palha, 2002) i zadužen je za transport 50% TH. Pored TH transportuje i retinoičnu kiselinu (Liz i sar., 2010). Sintetiše se u jetri, bubrezima, horoidnom pleksusu, retini i placenti (Richardson, 2009). TTR poseduje dva mesta za vezivanje T_4 , ali svaki TTR prenosi samo jedan molekul T_4

(Palha, 2002). Poluživot mu je 2 dana, a distribucija slična kao za TBG. Za razliku od TBG, sinteza TTR ne zavisi od koncentracije TH u serumu (Vranckx i sar., 1995).

Albumin se sintetise u jetri, a afinitet za vezivanje TH mu je najmanji od svih navedenih transportera. Njegov doprinos u transportu TH je minoran, pogotovo imajući u vidu zastupljenost ovog proteina u cirkulaciji (Refetoff, 2015). Na kraju, lipoproteini vezuju T_4 i u nekoj meri T_3 . Afinitet za vezivanje T_4 im je sličan kao i za TTR, ali je zanemarljiv njihov doprinos sveukupnom transportu TH (Benvenga i Robbins, 1993).

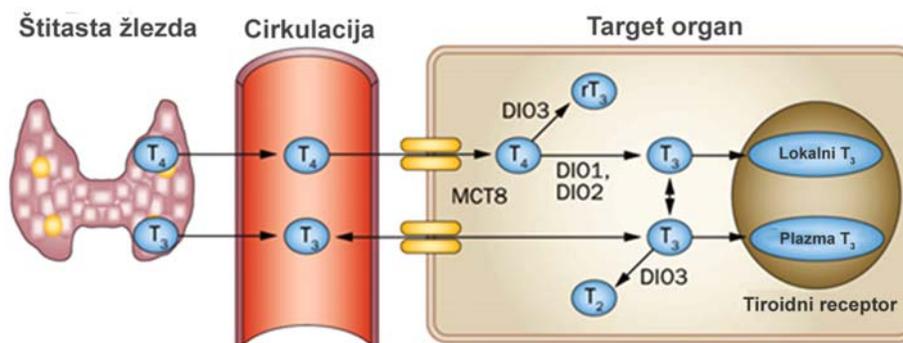
1.3. Molekularni mehanizam delovanja tiroidnih hormona

Delovanje TH, između ostalog zavisi od prisustva i aktivnosti receptora TH, kao i od aktivnosti enzima dejodinaza (DIO), koje lokalno, u tkivima, katalizuju dejodinaciju TH, na taj način određujući koncentraciju T_3 , biološki aktivne forme hormona.

1.3.1. Enzimi dejodinaze

U normalnim uslovima, štitasta žlezda sekretuje 10x više T_4 nego T_3 . Ipak, iako je sekrecija T_4 kvalitativno mnogo veća od T_3 , T_4 zahteva dejodinaciju i konverziju u T_3 , biološki aktivnu formu TH (Malik i Hodgson, 2002; Gereben i sar., 2008). Kod glodara, 50% cirkulišućeg T_3 direktno sekretuje štitasta žlezda, dok se 50% proizvodi u ciljnim organima dejodinacijom T_4 (Nguyen i sar., 1998; Schweizer i sar., 2008). Kod ljudi 80-90% T_3 se proizvodi u perifernim tkivima (Visser, 2017; Schweizer i sar., 2008).

Savremena paradigma delovanja TH podrazumeva da signalni putevi TH u pojedinačnim tkivima mogu da se menjaju, iako koncentracija TH u serumu ostaje nepromenjena. Ovo je moguće zahvaljujući lokalnoj aktivaciji ili deaktivaciji TH procesom dejodinacije. DIO su enzimi koji se diferencijalno ekspimiraju u različitim tkivima i upravo na taj način omogućavaju lokalnu regulaciju TH. Postoje tri tipa ovih enzima: DIO tip 1, 2 i 3, a svi zajedno pripadaju familiji selenoproteina, sa selenocisteinom u aktivnom centru enzima.



Slika 1.2 Transport i metabolizam tiroidnih hormona u ciljnim tkivima (preuzeto i prilagođeno iz Wiersinga i sar., 2014). T₄, tiroksin; T₃, trijodtironin, MCT8, monokarboksilatni transporter 8; DIO, dejodinaza tip 1, 2, 3.

DIO1 se eksprimira u folikularnim ćelijama štitaste žlezde, hipofizi, jetri i bubrezima. Enzim je lokalizovan u plazma membrani ćelija (Leonard i Rosenberg, 1978; Gereben i sar., 2008) i pokazano je da DIO1 ima glavnu ulogu u metabolizmu TH. Ona katalizuje dejodinaciju spoljašnjeg prstena T₄, pri čemu nastaje biološki aktivna forma T₃, ali i unutrašnjeg prstena T₄, pri čemu nastaje biološki neaktivan rT₃. Kada je u pitanju dejodinacija unutrašnjeg prstena, najveći afinitet DIO1 pokazuje za sulfatisane metabolite T₄ i T₃, katalizujući njihovu degradaciju. DIO1 takođe ima važnu ulogu u recikliranju joda koji se ponovo koristi za biosintezu hormona (Kopp, 2008; Schneider i sar., 2006). Ekspresija *Dio1* je pre svega pozitivno regulisana sa T₃ (Jakobs i sar. 1997; Toyoda i sar. 1995), a relativna koncentracija njene iRNK kod glodara zavisi od lokalne tkivne koncentracije hormona štitaste žlezde (Bianco i sar., 2014). Dodatno, na ekspresiju ovog gena utiču nutrijenti, polni hormoni, a limitirajući faktor za aktivnost svih DIO je selen (Bianco i sar., 2002; Koenig, 2005).

DIO2 se eksprimira u centralnom nervnom sistemu, adenohipofizi, mrkom masnom tkivu, skeletnim mišićima i srcu. Lokalizovana je u endoplazmatičnom retikulumu (Pitts i Hoffmann, 2017; Koenig i sar., 2005) a dejodinira samo spoljašnji prsten T₄ i doprinosi lokalnoj konverziji T₄ u bioaktivni T₃ (Kuiper i sar., 2005). Aktivnost DIO2 negativno je regulisana T₄. Na transkripcionom nivou, T₃ smanjuje relativnu koncentraciju iRNK *Dio2* u cerebralnom korteksu hipotiroidnih pacova. Ipak, glavna negativna regulacija DIO2 je posttranslacionim procesom ubikvitinacije i njegove degradacije u proteozomima kada je koncentracija TH visoka. Procesom ubikvitinacije enzim se deaktivira ali ukoliko koncentracija T₄ u serumu opadne, ovaj pad se

kompenzuje aktivacijom DIO2 i prevođenjem T_4 u T_3 (Bianco i Kim, 2006; Gereben i sar., 2008). Ovo objašnjava povećanje konverzije T_4 u T_3 kada je koncentracija T_4 snižena, što je potvrđeno kod pacova i kod ljudi, kako *in vitro* i tako *in vivo*. Kod ljudi, DIO2 u skeletnim mišićima doprinosi perifernoj produkciji T_3 (Salvatore i sar., 2013; Larsen, 2009). Njeno prisustvo u skeletnim mišićima (za razliku od mišića pacova) sugeriše da DIO2 značajno doprinosi ne samo lokalnoj, već i sistemskoj proizvodnji T_3 kod ljudi (Dentice i sar., 2013; Bianco i sar., 2002).

Ranije se smatralo da kod glodara najznačajniji doprinos sistemskoj proizvodnji T_3 ima DIO1 jetre. Međutim, genetski modifikovani sistemski i parcijalni „*knock out*“ sojevi miševa za DIO1 (D1KO) i DIO2 (D2KO) ukazuju da DIO2 doprinosi održavanju koncentracije T_3 u serumu, kao i da gotovo 50% T_3 u cirkulaciji proizvodi sama štitasta žlezda (Schweizer i sar., 2008; Schneider i sar., 2006). Oba modela imaju normalnu koncentraciju T_3 i povišenu koncentraciju T_4 u serumu, usled činjenice da visoka koncentracija T_4 obezbeđuje dovoljno supstrata da kompenzuje parcijalni gubitak aktivnosti dejodinaza (Schweizer i sar., 2008). Ovo povećanje T_4 može da bude rezultat njegove sekrecije iz štitaste žlezde i/ili smanjenog klirensa (Bianco i sar., 2002). Dodatno, stimulacija TSH može da dovede do povećanja koncentracije T_3 . Kod D2KO miševa javlja se dvostruko povećanje koncentracije TSH u odnosu na „*wild type*“ miševe, iako je kod D1KO miševa njegova koncentracija normalna (Schweizer i sar., 2008; Schneider i sar., 2006). DIO2 je neophodna za održavanje lokalne koncentracije T_3 u hipofizi i hipotalamusu, kao deo negativne povratne sprege tiroidne osovine (Ciechanover i sar., 2015). Sekrecija TSH zavisi od T_4 i od T_3 , koji se lokalno u hipofizi generiše aktivnošću DIO2 (Schneider i sar., 2001), čime se objašnjava zašto dolazi do povećanja TSH tokom deficijencije joda ili blagog hipotiroidizma, stanja u kojima koncentracija T_4 u serumu opada pre nego što se javi pad koncentracije T_3 .

DIO3 se eksprimira u mozgu, koži, jetri, crevima, placenti i gravidnom uterusu. Lokalizovana je u plazma membrani (Baqui i sar., 2003). Sposobna je samo za dejodinaciju unutrašnjeg prstena na T_4 , pa tako isključivo učestvuje u procesu degradacije TH i klirensu hormona iz cirkulacije (Dentice i Salvatore, 2011). Visoka aktivnost DIO3 u placenti i uterusu sprečava izlaganje fetusa visokim koncentracijama maternalnog T_3 (Hernandez i sar., 1998). U hipertiroidizmu je povišena, a u hipotiroidizmu snižena (Dentice i sar., 2013). DIO2 i 3 igraju važnu ulogu u regulaciji

tkivne koncentracije T_3 u mozgu i perifernom nervnom sistemu. DIO3 opada kada je koncentracija TH niska (u toku hipotiroidizma ili deficijencije joda), čime se odlažu negativni efekti hipotiroidizma u mozgu (Ciechanover i sar., 2015). Opadanje aktivnosti DIO3 smanjuje stopu degradacije T_4 , što se dovodi u vezu s povećanom ekspresijom DIO2 i povećanjem koncentracije T_3 u tkivu (Courtin i sar., 2005).

U jetri i manjoj meri u bubrezima, TH se konjuguju sa sulfatima ili glukuronskom kiselinom i tako eliminišu iz organizma (Kohrle i sar., 1988; Visser i sar., 1996). DIO1 ima najveći afinitet prema glukuronidovanim ili sulfatisanim metabolitima TH (de Vries i sar., 2015; Visser i sar., 1998), što dodatno potvrđuje primarnu ulogu ovog enzima u metabolizmu TH.

1.3.2. Tiroidni receptori

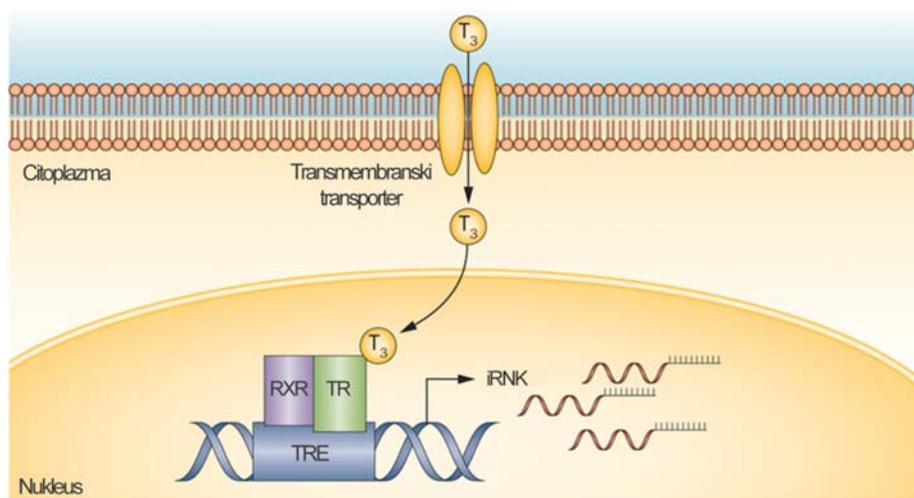
Primarna uloga TH je regulacija transkripcije ciljnih gena uključenih u kontrolu metabolizma, srčanog rada, kao i procesa razvića i razvoja organizma (Mullur i sar., 2014; Danzi i Klein, 2002; Samuels i sar., 1988). TH hormoni se vezuju za svoje receptore (eng. *thyroid hormone receptor*, TR) koji se odlikuju visokim afinitetom i specifičnošću (Wu i Koenig, 2001). Naime, TR postoji u dve izoforme, TR α i β . Heterogenost u ekspresiji gena za *Tr* posledica je posttranslacionih modifikacija te zbog toga TR α postoji u tri izoforme TR $\alpha 1, \alpha 2$ i $\alpha 3$, a TR β u četiri TR $\beta 1, \beta 2, \beta 3$ i $\Delta\beta 3$. TR $\alpha 1$ vezuje T_3 većim afinitetom nego TR $\beta 1$ (Ortiga-Carvalho i sar., 2015), dok TR $\alpha 2$ i 3 izoforme ne mogu da vežu T_3 (Ortiga-Carvalho i sar., 2014). Mutacije u izoformama TR dovode do pojave rezistencije na TH (Ortiga-Carvalho i sar., 2014), što za posledicu ima povećanje koncentracije ukupnog holesterola (HOL) i triglicerida (TG) u serumu (Sinha i sar., 2014). Ekspresija TR izoformi je tkivno specifična, a postoji razlika u ekspresiji tokom razvića u odnosu na adultne jedinke (Yen, 2001).

Tr $\alpha 1$ se dominantno eksprimira u srcu i mozgu. U toku razvoja, ekspresija Tr $\alpha 2$ je karakteristična za fetalni i neonatalni period. Tr $\beta 1$ je prisutan u jetri, skeletnim mišićima i bubrezima, dok je ekspresija Tr $\beta 2$ karakteristična za mozak, hipofizu, retinu i unutrašnje uho (Yen, 2001; Flamant i Gauthier, 2013). Tr $\beta 3$ se specifično eksprimira kod pacova u bubrezima i jetri, a izoforma Tr $\Delta\beta 3$ u plućima i slezini (Harvey i sar., 2007). Tokom razvića Tr $\alpha 1$ i Tr $\beta 1$ su visoko ekspimirani u trofoblastima i stromalnim ćelijama placente (Yen, 2001).

TR pripadaju velikoj superfamiliji jedarnih receptora kojoj pripadaju estrogenski (ER) i androgenski (AR) receptori, receptori za vitamin D (VDR), receptori aktivirani peroksisomskim proliferatorom (eng. *peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR), *liver X receptor* (eng. *liver X receptor*, LXR) i receptori za retinoičnu kiselinu (eng. *retinoid X receptor*, RXR). Ovi receptori imaju sličnu domensku organizaciju: amino terminalni A/B domen, centralni DNK-vezujući domen i karboksi terminalni, ligand vezujući domen (LBD) (Mangelsdorf i sar., 1995).

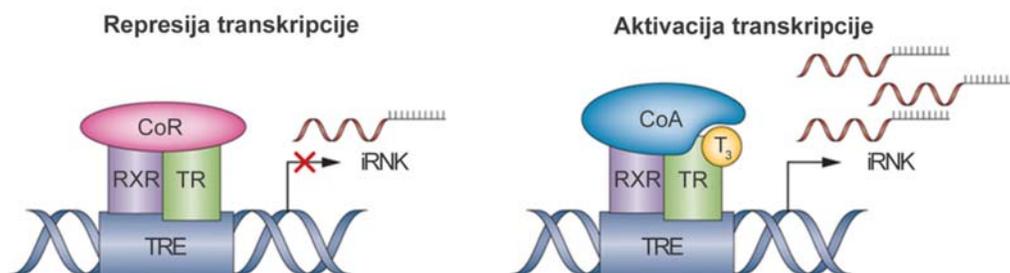
DNK-vezujući domen TR prepoznaje „*thyroid hormone response elements*“ (TRE), DNK sekvence u regulatornim promotorskim regionima target gena. Ove sekvence poseduju direktne, heksamerne AGGTCA ponovke s razmakom od 4 bazna para (*4 base pair gap*, DR4; AGGTCA_nAGGTCA). Njih prepoznaju TR, ali i drugi nuklearni receptori. LBD domen određuje specifičnost receptora za ligand i utiče na formiranje homodimera ili heterodimera sa drugim receptorima, dok aminoterminalni domen interaguje sa korepresorima, održavajući određen stepen bazalne represije gena (Yen, 2001).

TH ulaze u ćeliju, transportuju se u jedro i vezuju za svoj receptor (Slika 1.3). Važno je naglasiti da je TR konstitutivno vezan za TRE (Williams i Brent, 1995) i u odsustvu liganda dovodi do represije transkripcije ciljnog gena tako da do aktivacije ovog gena dolazi tek kad je T₃ vezan za TR (Slika 1.4).



Slika 1.3 Aktivacija tiroidnog receptora (TR) (preuzeto i prilagođeno iz Ortiga-Carvalho i sar., 2014). RXR, receptor za retinoičnu kiselinu; TRE, „*thyroid hormone response elements*“; iRNK, informacijska ribonukleinska kiselina.

Većina TRE je locirana uzvodno od promotora ciljnih gena, odnosno njihovih kodirajućih regiona (Yen, 2001). U zavisnosti od toga da li se za TRE vezuju kao homodimeri, ispoljavaju različiti efekat na ciljne gene. U odsustvu T_3 , homodimeri formiraju komplekse sa korepresorima, koji dovode do smanjenja transkripcije gena (Slika 1.4). T_3 smanjuje dimerizaciju $TR\alpha$ i $TR\beta$, kao i njihovo vezivanje za TRE (Andersson i sar., 1992; Miyamoto i sar., 1993; Ribeiro i sar., 1992). TR dimeri bolje interaguju sa korepresorima koji su uključeni u bazalnu represiju transkripcije gena u odsustvu T_3 . Suprotno, u prisustvu T_3 , ovaj kompleks se destabilizuje, korepresori disosuju i ostavljaju prostor za vezivanje koaktivatora. Formiranje TR- T_3 kompleksa je prvi, ključni korak u pozitivnoj regulaciji gena.



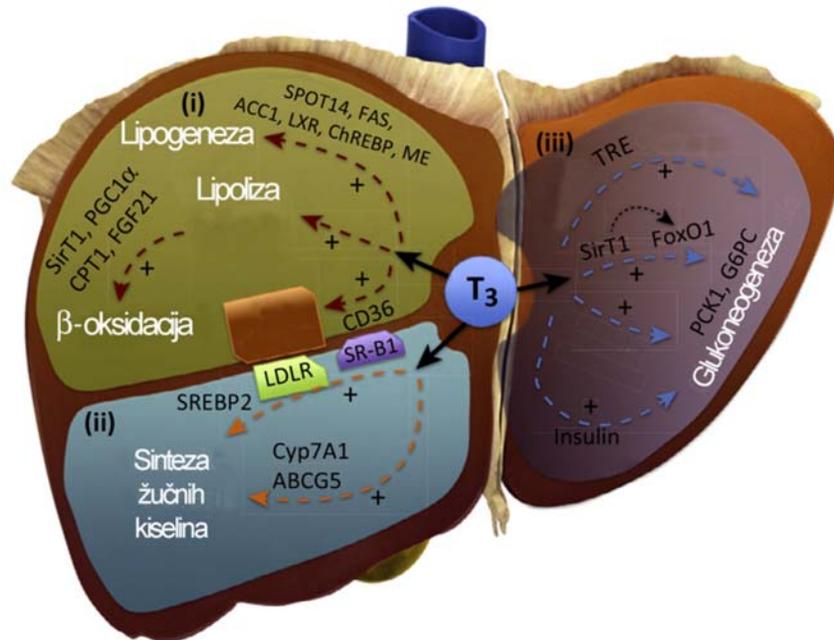
Slika 1.4 Regulacija genske ekspresije ciljnog gena trijodtironinom (T_3) (preuzeto i prilagođeno iz Ortiga-Carvalho i sar., 2014). CoR, korepresor; CoA, koaktivator; RXR, receptor za retinoičnu kiselinu; TR, tiroidni receptor; TRE, „*thyroid hormone response elements*“; iRNK, informacijska ribonukleinska kiselina.

Heterodimer TR-RXR predstavlja funkcionalni kompleks kojim se reguliše ekspresija T_3 regulisanih gena (Liu i Brent, 2010). RXR pojačava vezivanje TR za TRE sekvencu, a kompleks ostaje vezan za TRE ciljnog gena i u odsustvu T_3 , odnosno kada je za njih vezan korepresor (Yen, 2001; Ortiga-Carvalho i sar., 2014). Pored dimerizacije s RXR, pokazano je da TR mogu da heterodimerizuju i sa LXR, VDR i PPAR (Liu i Brent, 2010). Strukturna sličnost između TR sa drugim jedarnim receptorima ukazuje na potencijal za njihovu direktnu interakciju, ali i kompeticiju za RXR. Zato se RXR smatra ograničavajućim faktorom za delovanje TR (Evans i Mangelsdorf, 2014; Liu i Brent, 2010).

1.4. Delovanje tiroidnih hormona na lipidni metabolizam u jetri

T_3 je ključni metabolički regulator homeostaze lipida, jer reguliše ekspresiju gena esencijalnih za proces lipogeneze i lipolize, kao i biosinteze holesterola i njegove eliminacije u jetri (Coppola i sar., 2013; Kuhla i sar., 2011). U uslovima hipertireoze, povišena koncentracija TH u krvi stimuliše mobilizaciju masti dovodeći do povećanja nivoa masnih kiselina u serumu, ali i β -oksidacije masnih kiselina u jetri i mišićima. Koncentracija TH je obrnuto proporcionalna HOL i TG u serumu (Shin i Osborne, 2003; Tan i sar., 1998; Ito i sar., 2003).

Ključni T_3 -zavisni geni čiji su proteinski produkti uključeni u lipidini metabolizam u jetri su: *thyroid hormone responsive spot14 protein* (*Thrsp* ili *Spot14*), regulator procesa lipogeneze; sintaza masnih kiselina (eng. *fatty acid synthase*, *Fas*), enzim koji sintetiše zasićene masne kiseline; malat dehidrogenaza (eng. *malic enzyme*, *Me*), generator redukovanog $NADP^+$; protein 1c koji se vezuje za element regulisan sterolom (eng. *sterol regulatory element binding protein 1c*, *Srebp-1c*), aktivator sinteze masnih kiselina; *Fat*, transporter slobodnih masnih kiselina; karnitin palmitoiltransferaza-1-alfa (*Cpt-1a*), transporter masnih kiselina kroz membranu organela; receptor za LDL (*Ldl-r*), transporter LDL; Cyp7a1 (citohrom oksidaza 7a1), limitirajući enzim u procesu degradacije holesterola u vidu žučnih kiselina (Slika 1.5).



Slika 1.5 Regulacija metabolizma u jetri posredovana trijodtironinom (T₃) (preuzeto i prilagođeno iz Sinha i sar., 2014). Spot14 ili *Thrsp*, *thyroid hormone responsive spot14 protein*; Fas, sintaza masnih kiselina; Acc1, acil koenzim A karboksilaza 1; Lxr, „*liver X receptor*“, ChREBP, protein koji se vezuje za element regulisan ugljenim hidratima (eng. *carbohydrate regulatory element binding protein*); Me, malat dehidrogenaza; Sirt1, sirtuin 1; Pgc1α, koaktivator receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferativnim faktorom gama 1α; Cpt1, karnitin palmitoiltransferaza 1; Fgf21, fibroblasni faktor rasta 21; CD36 ili Fat, translokaza masnih kiselina; SR-B1, „*scavenger receptor class B type I*“; LDL-R, receptor za lipoprotein male gustine (LDL); SREBP2, protein 2 koji se vezuje za element regulisan sterolom (eng. *sterol regulatory element binding protein 2*); Cyp7a1, citohrom oksidaza 7a1; ABCG5, „*ATP-binding cassette*“ G5; TRE, „*thyroid hormone response elements*“, FoxO1, „*forkhead box protein O1*“; PCK1, fosfoenolpiruvat karboksikinaza 1; G6PC, glukoza-6-fosfat fosfataza.

Pored gena uključenih u regulaciju lipidnog metabolizma, T₃ reguliše i ekspresiju gena uključenih u proces glikogeneze (Slika 1.5; Sinha i sar., 2014).

U jetri, T₃ reguliše lipogenezu stimulacijom transkripcije *Thrsp*, *Srebp-1c* i *Lxr*, tri ključna lipogena transkripciona faktora (Beltowaski, 2008; Hashimoto 2006, 2007; Schultz i sar., 2000; Sinha i sar., 2014; Wu i sar., 2013). *Thrsp* je jedan od prvih gena pacova okarakterisanih na molekularnom nivou koji su regulisanih T₃ (Kinlawi sar., 1995). Ekspirimira se isključivo u jetri, belom i mrkom masnom tkivu i mlečnim žlezdama (Brown i sar., 1997). THRSP je jedarni protein, distribuiran tako da prati lokalizaciju lipogenih enzima u jetri (Brown i sar., 1997). Funkcija *Thrsp* je aktivacija lipogenih transkripcionih faktora uključenih u promenu metabolizma lipida sa lipolitičkog na lipogeni put (Brown i sar., 1997; Kinlawi i sar., 1995).

Fas je jedan od gena koje *Thrsp* direktno stimuliše (Rudolph i sar., 2014). FAS je multienzimski protein neophodan za *de novo* sintezu polinezasićenih masnih kiselina (eng., *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) (Cunningham i sar., 1998), odnosno palmitinske (C16:0) masne kiseline. Ekspresija *Thrsp* i *Fas* gena se brzo menja kao odgovor na stimulse kao što su TH, ugljeni hidrati i PUFA (Brown i sar., 1997; Campbell i sar., 2013; Kinlaw i sar., 1995; Kinlaw i sar., 1993). Clarke i sar. (1998) su pokazali blisku korelaciju između koncentracije *Thrsp* i *Fas* iRNK u jetri pacova stimulisanih T₃. Prevelika ekspresija *Thrsp* uzrokuje sintezu i akumulaciju lipida u jetri (Wu i sar., 2013), dok njegovo utišavanje sprečava razvoj masne jetre kod db/db miševa, kod kojih se spontano razvijaju dijabetes i gojazni fenotip (Huang i sar., 2013). Pored direktne T₃ regulacije, ekspresija *Thrsp* gena zavisi od SREBP i LXR (Wu i sar., 2013; Hashimoto i sar., 2007). Wu i sar. (2013) su pokazali da sintetski analog LXR, TO901317, direktno reguliše genski ekspresiju *Thrsp*, posredstvom *Srebp-1c* promovišući lipogenezu. Izoforma SREBP, SREBP-1c je zajedno s LXR uključena u sintezu masnih kiselina, dok je SREBP-2 važan za metabolizam holesterola (Copolla i sar., 2013). Ukoliko su koncentracije holesterola i masnih kiselina u serumu povećane, TH indukuju gensku ekspresiju SREBP-2, dok blokiraju SREBP-1c (Liu i Brent, 2010). Dodatno, T₃ smanjuje koncentraciju LDL u serumu stimulacijom ekspresije LDL-R (Malik i Hodgson, 2002). Ekspresija *Ldl-r* je posredovana SREBP-2, čime se obezbeđuje usvajanje holesterola i ubrzavanje njegove eliminacije. Pacijenti sa hipotiroidizmom imaju hiperholesterolemiju i akumulaciju LDL u jetri, koja se normalizuje tretmanom T₄ (Sinha i sar., 2014). Kod hipotiroidnih pacova relativna koncentracija iRNK za *Srebp-2* nije detektabilna, ali se vraća u prvobutno stanje nakon tretmana T₃ (Liu i Brent, 2010).

T₃ je direktni inhibitor PPAR α , senzora masnih kiselina u ćeliji i promotora njihove β -oksidacije u mitohondrijama i peroksizomima (Georgiadi i Kersten, 2012). Ovu inhibiciju ostvaruje direktnom kompeticijom za RXR (Juge-Aubry i sar., 1995). S druge strane, TH promoviše lipofagiju, glavni mehanizam kojim se obezbeđuju masne kiseline za β -oksidaciju u jetri (Sinha i sar., 2012). Blokiranje ovog procesa usled smanjene koncentracije i delovanja TH doprinosi razvoju masne jetre (Mao i sar., 2016). TH povećavaju ekspresiju acil koenzim A oksidaze, proteina uključenog u aktivaciju masnih kiselina, kao i CPT-1 koji obezbeđuje njihov transfer kroz membranu organela

(Jackson-Hayes i sar., 2003). TH takođe povećava ekspresiju ključnih gena sirtuin 1 (*Sirt1*) i fibroblasni faktor rasta 21 (*Fgf21*), koji učestvuju u metabolizmu lipida i njihovoj β -oksidaciji u jetri (Chang i Guarente, 2014; Adams i sar., 2010).

Prelazak na lipogeni put metabolizma nastaje delom usled preuzimanja viška slobodnih masnih kiselina iz seruma u jetru (Einstein i sar., 2010; Pickart, 1983). Ovo usvajanje posredovano je transportnim proteinom FAT (Wilson i sar., 2016), koji je lokalizovan na plazma membrani hepatocita i predstavlja glavni transporter slobodnih masnih kiselina u jetru (He i sar., 2011; Wilson i sar., 2016). Povećana ekspresija FAT u jetri mršavih miševa povećava usvajanje masnih kiselina, kao i skladištenje i sekreciju TG, a njegovo utišavanje štiti od nastanka masne jetre, snižava koncentraciju lipoproteina veoma niske gustine (eng. *very low density lipoprotein*, VLDL) i apolipoproteina B (ApoB) u serumu (Koonen i sar., 2007; Sinha i sar., 2014; Nassir i sar., 2013). Preuzimanje masnih kiselina se povećava nakon stimulacije TH (Wierzbicki i sar., 2009), a LXR je uz TR, direktan regulator njegove ekspresije (Wu i sar., 2013; Zhang i sar., 2003).

1.5. Koncept zdravog starenja

Starenje je kompleksan fiziološki proces koji karakteriše progresivno opadanje funkcija organizma, usporavanje metabolizma, akumulacija mutacija uz pogoršanje sveukupnog zdravlja (Jones i Boelaert, 2015). Dovodi se u vezu sa razvojem hroničnih oboljenja: dijabetesa, visokog krvnog pritiska, dislipidemije, bolesti jetre, endokrinih poremećaja, osteoporoze, sarkopenije, kancera (Goldsworthy i Potter, 2014; Ghezzi i sar., 2012; Sheedfar i sar., 2013; Bowers i sar., 2013; Chahal i Drake, 2007; De Minicis i sar., 2013; Sullivan-Gunn i Lewandowski, 2013). U osnovi mnogih od ovih bolesti leže promene u sistemu antioksidativne odbrane, mehanizmu detoksikacije i reparacije ćelije (Yang i sar., 2016; Thomas i sar., 2016; Pan i sar., 2016).

Statistički podaci govore da je oko 8,5% svetske populacije starije od 65 godina (Svetska zdravstvena organizacija, 2016). Prema procenama demografa do 2050. godine broj starijih od 65 godina dostići će 17% (podaci Svetske banke za 2016. godinu). Zemlje sa najstarijim stanovništvom su Japan (27%), Italija (23%), Grčka (22%), Nemačka i Portugal (21%), a sa najmlađim afričke države Angola i Čad (2%) i arapske zemlje Kuvajt (2%), Ujedinjeni Arapski Emirati i Katar (1%) (<http://data.worldbank.org/indicator/SP.POP.65UP.TO.ZS>).

U našoj zemlji, procenat stanovništva ove starosne dobi iznosi 18,7% (prema podacima Republičkog zavoda za statistiku, 2016). Po procenama, Srbija je pri vrhu evropske liste po starosti stanovništva (Sevo i sar., 2015; Eurostat Yearbook, 2016).

Produžavanje dužine života ne znači nužno produžavanje dužine zdravog života (Childs i sar., 2015). Kao odgovor Svetske zdravstvene organizacije na demografske promene u starosnoj kategoriji stanovništva, prevencija patoloških procesa i razvoja bolesti koje prate proces starenja, nastao je koncept zdravog starenja. Zdravo starenje je celoživotni proces, skup aktivnosti kojima se optimizuje i održava mentalno i fizičko zdravlje, ali i socijalno i ekonomsko blagostanje starijih osoba (Hansen-Kyle, 2005; Peel i sar., 2005). Takođe, predstavlja prevenciju sa ciljem izostanka ili odlaganja razvoja hroničnih bolesti, slabosti i nesposobnosti, čime se omogućava da se starenje organizma odvija prirodno (Hansen-Kyle, 2005; Bousquet i sar., 2015).

Ishrana je jedan od načina kojim se može uticati na proces starenja. Naime, upotreba namirnica bogatih antioksidantima, vitaminima, dijetnim vlaknima može uticati na smanjenje incidence hroničnih bolesti (Watson, 2017). Polifenoli, sekundarni metaboliti biljaka, poseduju korisna svojstva (antiinflamatorna, antioksidativna i antikancerska), tako da je njihova svakodnevna upotreba jedna od navika koje mogu da utiču na zdravo starenje ljudi (Vauzour i sar., 2010).

1.5.1. Starenje i funkcija štitaste žlezde

Starenje se dovodi u vezu sa opadanjem funkcije štitaste žlezde kod glodara i ljudi (Morganti i sar., 2005; Moreira i sar., 2005; Boelaert, 2013). Mnogi simptomi hipofunkcije štitaste žlezde odgovaraju promenama koje nastaju sa starenjem - netolerancija hladnoće, porast telesne mase, povišen HOL u krvi, opadanje mentalnih funkcija. U jednom trenutku smatralo se da je hipofunkcija štitaste žlezde jedan od glavnih uzroka simptoma starenja (Mariotti i sar., 1995), ali se sada zna da su ove promene rezultat i netiroidnih bolesti (Boelaert, 2013).

Sa starenjem se povećava učestalost oboljenja štitaste žlezde kod ljudi, tj. raste prevalenca tiroidnih autoimunskih bolesti i karcinoma (Morganti i sar., 2005; Kim i sar., 2010; Boelaert, 2013). Sa starenjem, koncentracija reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *reactive oxygen species*; ROS) u žlezdi raste a izlaganje visokim koncentracijama H_2O_2 izaziva fragmentaciju Tg i pojavu autoantigenosti (Duthoit i sar., 2000, 2001). Pored

antitela na Tg, prisutna su antitela na TPO i TSH-R. Autoantitela za TSH-R su odgovorna za nastanak hipertiroidizma dok se antitela na Tg i TPO dovode u vezu sa hipotiroidizmom (Furmaniak i Smith, 1990; Armengol i sar., 2001). Tiroidna autoantitela su retka kod zdravih stogodišnjaka dok su prisutna kod starih, hospitalizovanih bolesnika, što sugerise da ona nisu samo posledica starenja, već su u vezi sa bolestima karakterističnim za starenje (da Costa i Rosenthal, 2013). Akumulacija ROS u štitastoj žlezdi može da uzrokuje oštećenja na DNK i pojavu tiroidnih tumora koji sa starenjem postaju mnogo agresivniji (Sajid-Crockett, 2015). Takođe, preterana akumulacija slobodnih radikala u hipofizi tokom starenja dovodi do apoptoze TSH i GH ćelija (Vitale i sar., 2013).

Kada je u pitanju koncentracija TH i TSH kod ljudi, nije toliko izražen pad koncentracije TH, ali je uočeno da je kod stogodišnjaka povišen TSH u serumu (Klug i Adelman, 1979). Kod Wistar i Dutch-Miranda mužjaka pacova starenje se karakteriše smanjenom sekrecijom i koncentracijom ukupnog i slobodnog T₄ i T₃ u krvi (Donda i Lemarchand-Beraud, 1989; Cizza i sar., 1992; Moreira i sar., 2005; Silvestri i sar., 2008) uprkos nepromenjenoj ili blago povišenoj koncentraciji TSH (Donda i Lemarchand-Beraud, 1989). Kod ženki pacova, samo se ukupni T₄ snižava (da Costa i Rosenthal, 1996).

Posledica starenja je smanjenje sekrecije TSH usled pada dnevno-noćne produkcije i sekrecije TSH molekula smanjene bioaktivnosti (Cizza i sar., 1992). Donda i Lemarchand-Beraud (1989) su pokazali da se sa starenjem smanjuje osetljivost TSH ćelija na stimulatorno delovanje tirotropin oslobađajućeg hormona (eng. *thyrotropin-releasing hormone*, TRH), mada neki autori tvrde da je kod starih pacova očuvana bazalna i sekrecija TSH koja je stimulisana TRH (Borges i sar., 1998; Correa da Costa i sar., 2001).

Novija istraživanja su pokazala da je kod stogodišnjaka TSH u krvi visok i da ovaj parametar pozitivno korelira sa dužinom života (Atzmon i sar., 2009). Povišena koncentracija TSH (subklinička hipotiroza), niska koncentracija hormona rasta (eng. *growth hormone*, GH) i njegovog efekorskog molekula, insulinu sličnog faktora rasta 1 (eng. *insulin-like growth factor I*, IGF-1) sa starenjem (somatopauza), povezani su sa produženjem životnog veka (Gong i sar., 2014; Bowers i sar., 2013; Atzmon i sar., 2009).

Masa štitaste žlezde kod starih ljudi može da ostane nepromenjena, da se smanji ili poveća (Berghout i sar., 1990; Mariotti i sar. 1995). Kod pacova rastu telesna masa i apsolutna masa štitaste žlezde čitavog života, tako da relativna masa žlezde ostaje nepromenjena (Mariotti i sar., 1995; Takaoka, 1995; Rao-Rupanagudi i sar., 1992).

Aktivnost DIO1 se menja što ukazuje na poremećenu konverziju TH sa starenjem (Donda i Lemarchand-Béraud, 1989; da Costa i Rosenthal, 2013). U štitastoj žlezdi starih mužjaka pacova aktivnost ovog enzima se smanjuje, dok suprotno, u hipofizi, dolazi do povećanja aktivnosti DIO1 i DIO2, što ukazuje na postojanje adaptivnog mehanizma kojim se kompenzuju niske koncentracije TH u cirkulaciji rezultujući neprimereno normalnim novoom TSH u krvi starih pacova (Donda i Lemarchand-Béraud, 1989). Aktivnost DIO2 u hipofizi se smanjuje nakon orhidektomije pacova u kasnom srednjem dobu (Šošić-Jurjević i sar., 2012), kao i usled pada koncentracije endogenog testosterona sa starenjem (Zirkin i Tenover, 2012).

U ciljnim organima kao što su jetra i bubrezi ipak postoji razlika u koncentraciji TH. Schomburg i sar. (2007) su ukazali na polne razlike u ekspresiji *Dio1* u jetri. Naime, mladi mužjaci imaju veću aktivnost a manju gensku ekspresiju u poređenju sa mladim ženkama (Riese i sar., 2006). Međutim, poređenjem ovih parametara kod starih miševa uočava se da aktivnost DIO1 ostaje relativno stabilna u jetri ženki dok se kod mužjaka smanjuje (Schomburg i sar., 2007; Donda i Lemarchand-Béraud, 1989). U bubrezima ovaj pad nije toliko izražen te starenje nema veliki uticaj na promenu u ekspresiji DIO1 (Schomburg i sar., 2007; Silvestri i sar., 2008). Nasuprot tome, u jetri mužjaka pacova tokom starenja očuvana je osetljivost DIO1 na regulaciju androgenima (Šošić-Jurjević 2012, 2015).

Kada je reč o DIO2, u mišićima zdravih starih ljudi njena aktivnost opada (Peeters i sar., 2005, 2006), što doprinosi smanjenju produkcije serumskog T_3 , dok aktivnost DIO2 u jetri ostaje nepromenjena (Visser i sar., 2016). U modelu izazvanog i prirodnog starenja kod miševa, DIO3 pokazuje neočekivan rast aktivnosti u jetri, iako je njena primarna ekspresija vezana za fetalno tkivo (Visser i sar., 2016). Ovaj rast može biti posledica oslabljene GH/IGF1 osovine kod starih životinja (Visser i sar., 2016), iako rezultati Silvestri i sar. (2008) sugerišu da koncentracija DIO3 nije detektabilna u njihovom modelu. Međutim, indukcija DIO3 utiče na lokalnu koncentraciju TH u tkivu, usled

povećane deaktivacije T_3 i T_4 i njihove snižene produkcije u tkivu bez ometanja sistemske koncentracije TH (Gereben i sar., 2008).

Sa starenjem raste koncentracija TTR i TGB kod miševa i ljudi (Ding i Kopchick, 2011; Serot i sar., 1997; Savu i sar., 1991; Vranckx i sar., 1995) kao kompenzatorni mehanizam na smanjenje produkcije TH. Usvajanje T_3 putem membranskih transportera podleže *species*- i tkivno-specifičnoj modulaciji ekspresije. Silvestri i sar. (2008) su pokazali da je kod 24 meseca starih pacova genska i proteinska ekspresija MCT8 snižena u jetri ali ne i u bubrezima. U jetri miševa uočava se povećanje genske ekspresije skoro svih transportera TH, dok *Mct8* ostaje nepromenjen (Engels i sar., 2015).

U jetri starih pacova se ne uočavaju promene u ekspresiji $TR\alpha 1$ dok genska i proteinska ekspresija $TR\beta 1$ progresivno rastu (Silestri i sar., 2008). U bubrezima, rastu i genska i proteinska ekspresija $TR\alpha 1$ u odnosu na mlade životinje (Silestri i sar., 2008). Međutim, kako jedarna koncentracija $TR\beta 1$ opada u oba organa sa starenjem, to može da objasni smanjenu ekspresiju DIO1 (i sniženu koncentraciju TH), što sugerise promenjen biološki odgovor ovih organa na delovanje TH (Visser, 1996; Visser i sar., 2016).

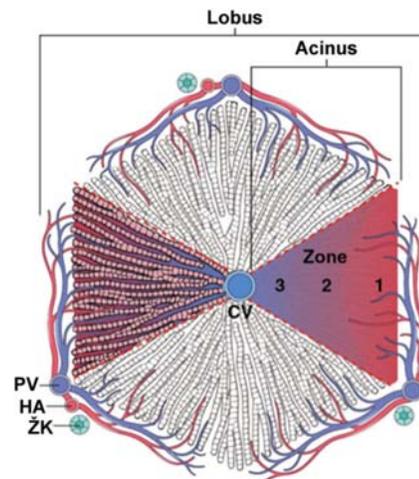
Sa starenjem opada koncentracija selena u krvi (Cann i Ames, 2011). Ovaj mikroelement uključen je u proces antioksidativne zaštite u štitastoj žlezdi, pa stoga njegov pad može dovesti do povećanja oksidativnog stresa i razvoja tiroidnih bolesti (Vitale i sar., 2013; Schomburg, 2017). Takođe, DIO su selenocisteinski enzimi, tako da sa starenjem deficit selena može uticati na njihovu aktivnost (Beckett i sar., 1992).

1.6. Struktura i funkcija jetre

Jetra je najznačajniji i najkompleksniji metabolički organ u ljudskom telu. Podeljena je na desni i levi režanj, koji su obavijeni omotačem od vezivnog tkiva. Režnjevi se sastoje iz jetrinih lobusa. U centru heksagonalnog lobusa nalazi se terminalna grana centralne vene oko koje su raspoređeni nizovi hepatocita u obliku gredica izgrađenih od jednog ili dva sloja ćelija. Između gredica nalaze se žučni kanalići. Jetra je odlično prokrvljena jer do nje dospeva krv iz hepatične arterije i portalne vene. Njihovim grananjem u arteriole i venule formiraju se sinusoidi, koji formiraju kapilarnu mrežu u jetri.

Portna trijada je strukturna jedinica jetre jer omogućava osnovu za njene metaboličke i sekretorne funkcije (Krishna, 2013). Sastoji se od hepatične arterije, portalne vene i terminalnih grana žučnih kanalića (Slika 1.6). Krv od portne trijade teče kroz sinusoidne do centralne vene, dok žuč putuje u suprotnom smeru, od hepatocita ka većim žučnim kanalima i žučnoj kesi. Iako postoji nekoliko klasifikacija lobusa, histološki i funkcionalno prihvaćen je koncept acinusa, koji predstavlja prostor između centralnih portalnih vena i trijada (Slika 1.6).

Acinus je podeljen na 3 zone. Zona 1 se naziva periportalna (Slika 1.6). Najbogatija je kiseonikom i u njoj se obavlja proces lipolize, oksidativne fosforilacije i glukoneogeneze. Zona 2 predstavlja prelaz između periportalne i perivenozne zone, a u njoj se obavlja metabolizam ksenobiotika. Zona 3 ili perivenozna zona predstavlja zonu u koju dospeva dezoksigenisana krv i u njoj se obavlja proces lipogeneze, glikolize i ciklus trikarbonskih kiselina (Colnot i Perret, 2011).



Slika 1.6 Strukturna i funkcionalna jedinica jetre (preuzeto i prilagođeno sa <https://www.studyblue.com/#flashcard/flip/8168027>). PV, portalna vena; CV, centralna vena; HA, hepatična arterija; ŽK, žučni kanal.

Hepatociti su najbrojnija populacija ćelija koja čini jetrin parenhim dok stromu čine endotelske ćelije sinusoida, Kupferove ćelije kao i jetrene stelatne (Ito) ćelije. Metaboličku funkciju jetre obavljaju hepatociti koji stvaraju i izlučuju žuč, regulišu homeostazu ugljenih hidrata i holesterola, vrše sintezu lipida i izlučuju lipoproteine

plazme, proizvode ureu, serumske albumine, faktore zgrušavanja, enzime i slično; omogućavaju metabolizam ili detoksikaciju lekova i drugih molekula. Izuzetna vaskularizovanost omogućava jednostavnu razmenu metabolita između krvi i jetre, ali i interakciju sa imunskim ćelijama (McCuskey i Reilly, 1993; Fraser i sar., 1995; McCuskey, 2000). Jetrene endotelske ćelije su specijalizovane za efikasno obavljanje procesa ultrafiltracije i endocitoze, Kupferove ćelije posreduju u imunskom odgovoru, a Ito ćelije predstavljaju depo vitamina A.

1.6.1. Morfološke i funkcionalne promene u jetri sa starenjem

Progresivno sa starenjem smanjuje se masa i volumen jetre (Chao i sar., 2002) kao i protok krvi kroz nju (Anantharaju i sar., 2002). Kapilari sinusoida postaju sve više nalik kapilarima nefenestriranog tipa, zadebljavaju, smanjuje im se poroznost i broj fenestri (defenestracija), što uzrokuje promenu u usvajanju hilomikrona, eliminaciji lekova i nakupljanja štetnih makromolekula (Couteur i sar., 2008). Takođe, stvaraju se depoziti lipofuscina i multijedarnih ćelija u parenhimu jetre, a dolazi i do proliferacije žučnih kanala (Chao i sar., 2002). Smanjenjem sekretornog aparata u hepatocitima smanjuje se i koncentracija aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) i adenzin trifosfata (ATP), usled poremećenog rada mitohondrija (Kim i sar., 2015; Anantharaju i sar., 2002; MacQueen i sar., 2011). Koncentracija gama glutamil transferaza (GGT) raste sa starenjem (Speisky, 1992).

Koncentracija TG i HOL u jetri raste, dok koncentracija fosfolipida ostaje nepromenjena (Anantharaju i sar., 2002; Holzer i sar., 2013). Kod ljudi i pacova smanjuje se eliminacija LDL usled smanjenja ekspresije LDL-R (Ericsson i sar., 1991; Parini i sar., 1999; Grundy i sar., 1985), kao i klirens hilomikrona usled smanjene propustljivosti endotelskih ćelija (Field i Gibbons, 2000; Couteur i sar., 2008). Smanjenje konverzije HOL u jetri smanjenjem aktivnosti Cyp7a1 doprinosi dislipidemiji povezanoj sa starenjem (Galman i sar., 2007). Važno je napomenuti da postoje razlike u profilu lipoproteina između pacova i ljudi. Konkretno, pacovi su „HDL životinje“ sa relativno niskom koncentracijom VLDL i LDL (Muniz i Bastida, 2008). Takođe, pacovima nedostaje ili imaju nisku aktivnost enzima holesterol estar transfernog proteina (Ponsin i sar., 1992; Oschry i Eisenberg, 1982), koji je zadužen za transfer HOL estara sa HDL na VLDL ili hilomikrone. Kod pacova sa normalnom

koncentracijom holesterola HDL čine 75% udela ukupnog HOL, dok je kod ljudi najviša koncentracija LDL, uz umerene koncentracije HDL i VLDL (Muniz i Bastida, 2008).

Sa starenjem dolazi do narušavanja ravnoteže između sinteze i β -oksidacije masnih kiselina u pravcu sinteze i njihove akumulacije, čime se stvaraju predispozicije za nastanak masne jetre i nealkoholne masne bolesti jetre (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD (Kuhla i sar., 2011; Wilsoni sar., 2016). Tollet-Egnell i sar. (2001) su pokazali povećanje transkripcije gena *Thrsp*, *Fas* i stearil CoA desaturaza (*Scd-1*) kod starih životinja. Takođe, sa starenjem raste ekspresija *Fat* kod pacova i ljudi, što se takođe dovodi u vezu sa pojavom NAFLD (Wilson i sar., 2016; Sheedfar i sar., 2014).

1.6.2. Reaktivne vrste kiseonika i antioksidativna zaštita u jetri

Oksidativni metabolizam u jetri podrazumeva produkciju visoko reaktivnih molekula koji sadrže kiseonik. Štitasta žlezda direktno utiče na ovaj proces jer TH, povećavajući ćelijsku respiraciju u mitohondrijama, povećavaju koncentraciju ROS u ćeliji (Erdamar i sar., 2010; Messarah i sar., 2011). ROS se generišu u mitohondrijama procesom aerobnog metabolizma (90%), ali i oksidativnom eksplozijom tokom imunskog odgovora ili detoksikacijom lekova i drugih ksenobiotika (Young i Woodside, 2001; Krishnamurthy i Wadhwani, 2012).

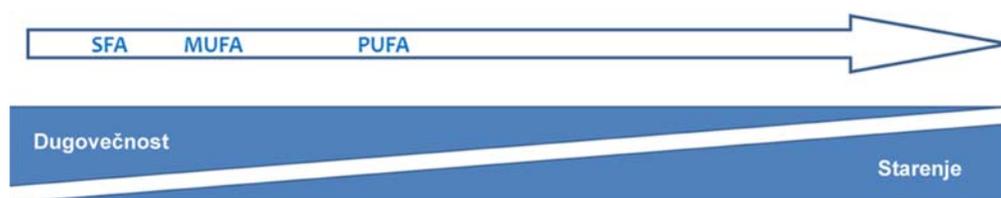
U ROS spadaju hidroksil radikal (HO^\bullet), superoksidni anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), singlet kiseonika ($^1\text{O}_2$), azot monoksid radikal (NO^\bullet) i brojni lipidni peroksidi (LOO^\bullet). H_2O_2 nije slobodni radikal *de facto* ali nastaje procesom deaktivacije ROS aktivnošću antioksidativnih enzima i u velikim koncentracijama ispoljava štetne efekte po ćeliju. Oksidativni stres nastaje kada dođe do remećenja ravnoteže između prooksidanata i antioksidanata u ćeliji, odnosno molekula koji oštećuju i štite ćeliju (Catalá, 2012). Iako su neki od ROS signalni molekuli, njihova akumulacija ili nedovoljna eliminacija uzrokuje oštećenje proteina, DNK i lipida (Halliwell, 2007).

ROS menjaju osobine ćelijske membrane kao što su fluidnost i propustljivost, transport jona i inhibicija metaboličkih procesa (Pamplona, 2008) ali utiču i na gubitak aktivnosti enzima, oštećuju DNK uslovljavajući pojavu senescentnog (starog) fenotipa ćelija (Ziegler i sar., 2015; Catalá, 2012; Hulbert, 2007). Smatra se da šteta načinjena

delovanjem ROS ima centralnu ulogu u razvoju hroničnih bolesti i kancera (Khansari i sar., 2009; Pham-Huy i sar., 2008; Vitale i sar., 2013).

PUFA u fosfolipidima membrane su posebno podložne lipidnoj peroksidaciji u prisustvu ROS (Gonzalez-Covarrubias, 2013). Zasićene (eng. *saturated fatty acids*, SFA) i mononezasićene masne kiseline (eng. *monounsaturated fatty acids*, MUFA) su otporne na peroksidaciju, dok PUFA vrlo lako bivaju oštećene, a podložnije su što im je veći broj nezasićenih dvostrukih veza (Gonzalez-Covarrubias, 2013; Hulbert, 2008). Ovaj proces stvara LOO^{*} radikal koji domino efektom stvara nove radikale koji nastavljaju da oštećuju membranu. Krajnji produkti lipidne peroksidacije, malonildialdehid (MDA) i konjugovani dieni predstavljaju mutagene i kancerogene molekule (Pham-Huy i sar., 2008) tako da njihovo uklanjanje može predstavljati ključ u sprečavanju bolesti povezanih sa starenjem.

Hulbert (2007) je pokazao da su povećan MUFA/PUFA odnos i zastupljenost SFA u membrani povezani sa nižom stopom lipidne peroksidacije, oksidativnog oštećenja i povećanjem dužine životnog veka (Slika 1.7). Stoga varijacija u lipidnom sastavu membrane, odnosno desaturacija membrane, direktno utiče na stepen oksidativnih oštećenja fosfolipida membrane i životni vek kod mnogih vrsta sisara (Hulbert, 2007, 2008; Gonzalez-Covarrubias, 2013).



Slika 1.7 Stepen zasićenosti u fosfolipidima plazma membrane direktno utiče na dugovečnost, odnosno proces starenja organizma (preuzeto i prilagođeno iz Naudí i sar., 2013). SFA, eng. *saturated fatty acids*, zasićene masne kiseline; MUFA, eng. *monounsaturated fatty acids*, mononezasićene masne kiseline; PUFA, eng. *polyunsaturated fatty acids*, polinezasićene masne kiseline.

Održavanje homeostaze u uslovima povećane koncentracije ROS postiže se aktivacijom endogene antioksidativne zaštite (Halliwell i Gutteridge, 1990; Halliwell i sar., 1992; Johnson, 2002). Odbrana od ROS podrazumeva njihovo uklanjanje u enzimskim reakcijama, eliminaciju elektron donorima kao što su redukovani glutation (GSH), vitamin C, vitamin E, bilirubin i mokraćna kiselina, ili eliminaciju prooksidativnih metala vezivanjem za specifične proteine (Krishnamurthy i Wadhwani, 2012).

Antioksidativni enzimi superoksid dismutaza 1 i 2 (eng. *superoxide dismutase*, SOD1 i 2), katalaza (eng. *catalase*, CAT), glutation peroksidaza (eng. *glutathion peroxidase*, GPx) i glutation reduktaza (eng. *glutathion reductase*, GR), kao i GSH, sposobni su da stabilizuju ili deaktiviraju slobodne radikale pre nego što nanesu štetu ćelijskim makromolekulima i organelama.

U ćelijama sisara postoji nekoliko izoformi SOD. SOD1 (CuZnSOD) izoforma je lokalizovana u citoplazmi i organelama gotovo svih tipova ćelija. U aktivnom centru enzima su cink i bakar. SOD2 (MnSOD) nalazi se u mitohondrijama i poseduje mangan u aktivnom centru. EC-SOD (vanćelijska SOD) je cink bakar SOD koja se razlikuje od SOD1. Sintetiše se u fibroblastima i endotelskim ćelijama a nalazi se u intersticijalnom prostoru tkiva, plazmi, limfi i sinovijalnoj tečnosti. SOD katalizuje reakciju dismutacije $O_2^{\cdot -}$ do H_2O_2 :



SOD1 i SOD2 redukuju $O_2^{\cdot -}$ nastao u citoplazmi, tokom procesa respiracije ili β -oksidacije u mitohondrijama (Guan i sar., 1998; Majima i sar., 1998), dok nastali H_2O_2 uklanjaju CAT ili GPx.

CAT je enzim koji katalizuje dvostepenu konverziju H_2O_2 do H_2O i O_2 .



U aktivnom centru enzima je hem grupa. Brzina reakcije koju katalizuje je ekstremno brza, što implicira da je ovaj enzim nemoguće zasititi *in vivo* (Chance i Oshino, 1971). Lokalizovana je u peroksizomima, u kojima se tokom procesa β -oksidacije masnih kiselina produkuju ROS. Najaktivnija je u jetri i eritrocitima, ali je prisutna i u ostalim tkivima.

GPx je enzim koji katalizuje oksidaciju GSH uz utrošak, odnosno eliminaciju H_2O_2 .



LOO^{\cdot} takođe može da bude supstrat ovom enzimu, koji stoga ima ulogu u popravci oštećenja nastalih lipidnom peroksidacijom membrane. GPx zahteva prisustvo selena u svom aktivnom centru. Iako je rasprostranjen u svim tkivima, najveća koncentracija

ovog enzima je u jetri. Subcelularno, distribucija GPx obuhvata citoplazmu, mitohondrije, jedro i membranu, tako da je glavni skavandžer (eng. *scavenger*; uklanjivač) H₂O₂ u ovim delovima ćelije (Freeman i Meredith, 1988).

Za aktivnost ovog enzima neophodno je konstantno prisustvo redukovano GSH. GR je enzim zavisen od flavin nukleotida i ima sličnu tkivnu distribuciju kao GPx. GR katalizuje reakciju redukcije oksidovanog GSH (GSSG) uz potrošnju NADPH⁺ kao kofaktora.



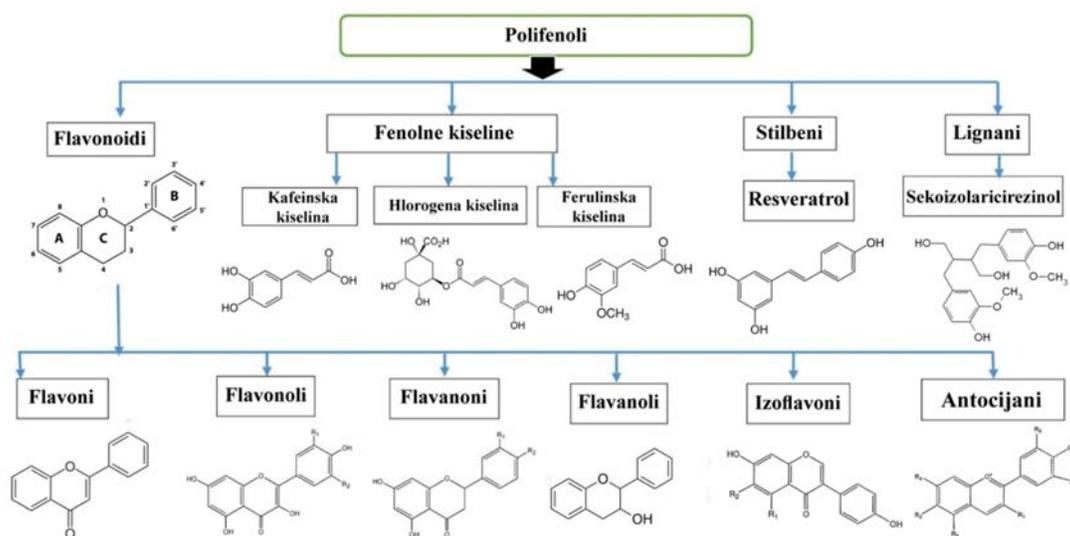
GSH je glavni izvor tiolnih grupa (-SH) u unutarćelijskim kompartmentima i odgovoran je za održavanje redoks ravnoteže u ćeliji. GSH redoks ravnoteža predstavlja odnos GSH:GSSG i koristan je marker kojim se određuje redoks stanje ćelije (Zhou i sar., 2014). GSH je sposoban da direktno ispolji antioksidativnu funkciju, sakupljanjem slobodnih radikala. Povećanjem GSH:GSSG odnosa podiže se antioksidativni kapacitet, dok njegovo smanjenje ukazuje na oksidativni stres i smanjenu oksidativnu odbranu. Odnos GSH:GSSG je u normalnim uslovima uvek u korist redukovano GSH (9:1), kao rezultat aktivnosti enzima GR. Promene u GSH:GSSG se dovode u vezu sa procesima koji dovode do dijabetesa i bolesti jetre (Tiwari i sar., 2013; Narasimhan i sar., 2010). Pored toga, GSH predstavlja esencijalni kofaktor za GPx u reakciji eliminacije H₂O₂.

1.6.3. Starenje i antioksidativni enzimi u jetri

Stopa oksidativnog oštećenja raste sa starenjem, kako opada efikasnost antioksidativnog sistema zaštite i reparacionih mehanizama organizma (Rahman, 2007). Ukoliko se ROS brzo ne uklone, izazivaju oštećenja proteina i masnih kiselina te dolazi do akumulacije oksidovanih i glikooksidovanih produkata koji izazivaju ćelijsko starenje (Ziegler i sar., 2015). Glikacija koja se dešava sa starenjem ugrožava aktivnost CAT i remeti mitohondrijsku antioksidativnu zaštitu (Bakala i sar., 2012). Snižavanje aktivnosti SOD se dovodi u vezu s razvojem Alchajmerove bolesti (Esposito i sar., 2006), dok remećenje aktivnosti CAT i GPx doprinosi razvoju sarkopenije kod starih pacova (Sullivan-Gunn i Lewandowski, 2013). Preterana koncentracija ROS u mitohondrijama, zajedno s padom antioksidativne odbrane koja je inače veoma aktivna u jetri, dovodi do akumulacije lipida, razvoja NAFLD i hepatocelularnog kancera (De Minicis i sar., 2013; Floreani, 2007; Petersen i sar., 2003).

1.7. Polifenoli i citrusni flavanoni

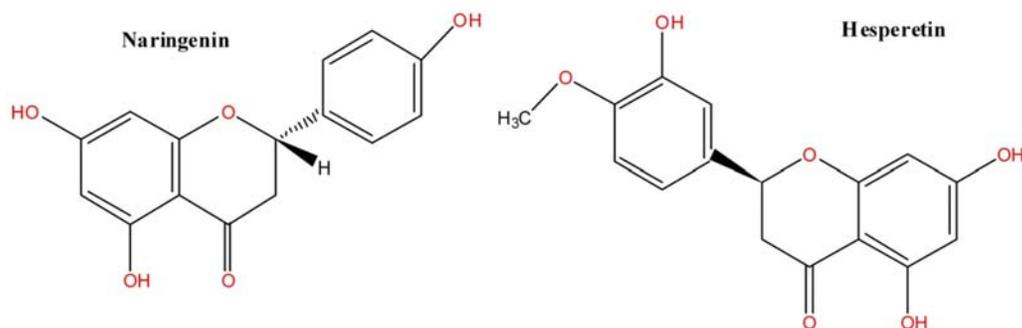
Flavonoidi su sekundarni metaboliti biljaka rasprostranjeni u voću, povrću, orašastim plodovima, kakau, čaju, kafi i vinu (Manach i sar., 2004). Uz fenolne kiseline, lignane i stilbene, flavonoidi spadaju u polifenole, jedinjenja sa osnovnom strukturom aromatičnog prstena i jednom ili više hidroksilnih grupa, čiji broj i položaj definiše biološka svojstva ovih jedinjenja (Slika 1.8). Flavonoidi se prema strukturi dele na: flavanone, flavone, flavonole, flavanole (katehine), izoflavone i antocijane (Slika 1.8). Citrusni flavanoni su klasa flavonoida isključivo zastupljena u citrusnom voću, gde predstavljaju 95% od ukupnog sadržaja flavonoida (Erlund, 2004). U prirodi se javljaju u formi aglikona i glikozida, kao i njihovih metilovanih derivata. Aglikoni su bioaktivni oblik flavonoida, dok glikozidi predstavljaju aglikone vezne za šećernu grupu, najčešće glukozu (Chanet i sar., 2012). Glavni aglikoni citrusa (Slika 1.9) su naringenin (NAR) u grejpfrotu, hesperetin (HES) u pomorandži i mandarini i eriodiktiol u limunu (Khan i sar., 2013). Analizi aglikona su glikozidi naringin, hesperidin i eriocitrin koji su u različitom procentu zastupljeni u citrusnom voću (Khan i sar., 2013).



Slika 1.8 Podela polifenola.

Sadržaj flavanona zavisi od dela voća u kom se nalaze. Čvrsti delovi voća, pogotovo albedo (beli sunderasti deo) ili membrane koje razdvajaju segmente ploda, su najbogatiji flavanonima i imaju ih više u poređenju sa sokom. Koncentracija glikozida flavanona u ceđenom soku od pomorandže je u opsegu od 14-77 mg / 100mL, dok koncentracija

aglikona varira u opsegu 19-47 mg na 100 g (Peterson i sar., 2006). Sadržaj glikozida naringina u ceđenom soku od grejpfruta varira između 17-76 mg / 100 mL, dok na 100 g voća ima 30 mg aglikona (Peterson i sar., 2006). Prosečan dnevni unos flavanona u obliku aglikona procenjen je na 2,7-78 mg kod odraslih osoba (Chanet i sar., 2012).



Slika 1.9 Strukturna formula naringenina i hesperetina.

Pre apsorpcije, ishranom uneti glikozidi flavanona moraju da hidrolizuju do aglikona, da bi stekli pun kapacitet biološkog dejstva. Ovu reakciju katalizuju enzimi glikozidaze poreklom iz mikrobiote debelog creva (Chanet i sar., 2012). Nakon usvajanja, flavonoidi se metabolizuju u jetri, pri čemu dolazi do adicije hidroksilne grupe ili transformacije aglikona procesom metilacije, glukuronidacije ili sulfatacije. Kao rezultat navedenog, u sistemskej cirkulaciji flavanoni uglavnom postoje kao sulfovani i glukuronidovani metaboliti (Tang i sar., 2012; Wang i sar., 2006). Međutim, i glikozidi se takođe mogu naći u cirkulaciji (Erlund i sar., 2004).

Pošto flavanoni moraju da dospeju do debelog creva pre apsorpcije, njihova maksimalna koncentracija u plazmi dostiže se nakon 6h od ingestije (Chanet i sar., 2012). Ekskrecija flavanona putem urina dešava se tokom 24h od ingestije, pri čemu je pik ekskrecije između 6 i 12h nakon unosa. Stepem izlučivanja ovih supstanci urinom, izražen kao procenat od ukupnog unosa flavonoida, sugeriše da su flavanoni među najiskoristljivijim, odnosno biodostupnim flavonoidima (Felgines i sar., 2000).

1.7.1. Biološka dejstva polifenola i citrusnih flavanona

1.7.1.1. Potencijalno štetna biološka dejstva – uticaj na endokrinu homeostazu

Po definiciji Evropske komisije, endokrini ometač (eng. *endocrine disrupting compound*; EDC) je egzogena supstanca ili smeša supstanci koja menja funkciju

(funkcije) endokrinog sistema i uzrokuje štetne efekte na zdravlje intaktnog organizma ili njegovog potomstva. Sličnu definiciju propisuje i Evropsko endokrinološko društvo koje kaže da su EDC hemikalije koje imitiraju, blokiraju ili ometaju delovanje hormona u endokrinom sistemu, čime mogu izazvati štetne zdravstvene efekte u organizmu.

Efekti EDC najviše su ispitivani na reproduktivnoj osovini. Naime, masovna izloženost EDC u toku prenatalnog i postnatalnog razvića može da ostavi trajne posledice po reproduktivno zdravlje i doprinese porastu infertilnosti u populaciji, imanentne odlike savremenog ekonomski razvijenog dela sveta. Posebno je važno ispitati izlaganje organizma EDC u specifičnim, osetljivim periodima kao što su prenatalni i pubertalni ili kod starih organizama (Diamanti-Kandarakis i sar., 2009). Mnogi EDC deluju na reprodukciju i razviće tako što interferiraju sa signalnim putevima ER i AR (Shanle i Xu, 2011; Luccio-Camelo i Prins, 2011).

Ksenobiotici (hemijske supstance koje se nalaze u organizmu, ali se u njemu ne proizvode) mogu da utiču na tiroidnu homeostazu delujući na proces sinteze i sekrecije TH, usvajanja i organifikaciju joda, transporta i metabolizam TH, kao i centralnu TRH-TSH regulaciju (Capen, 1997). Mužjaci pacova su osetljiviji na delovanje ksenobiotika u odnosu na ženke, s' obzirom na viši nivo TSH u krvi (Donda i Lemarchand-Beraud, 1989), te predstavljaju bolji (osetljiviji) model za ispitivanje efekata različitih supstanci na tiroidnu homeostazu.

Sa druge strane, brojna istraživanja govore da mužjaci brže metabolišu ksenobiotike, zbog testosterona koji stimulatorno deluje na detoksikacioni mehanizam u jetri i bubrezima. Neki od enzima koji su pod direktnom kontrolom testosterona su CYP enzimi (npr. CYP2C18 i CYP3A2), flavin monooksigenaze i sulfotransferaza (Mugford i Kedderis, 1998; Mori i sar., 2007). Međutim, kako sa starenjem koncentracija testosterona progresivno opada, to korelira sa padom detoksikacione moći i farmakokinetike ksenobiotika kod starih pacova (Schmucker, 2005; Lee i sar., 2011, 2008; Mori i sar., 2007). Za kritične periode životnog ciklusa, kada ksenobiotici mogu da imaju najpogubniji uticaj smatraju se periodi u kojima nema sekrecije testosterona ili je njegova koncentracija u serumu niska, kao što je slučaj sa prepubertalnim i starim pacovima (Mugford i Kedderis, 1998; Mangelsdorf i sar., 2003). Dodatno, stopa sposobnosti regeneracije jetre opada sa starenjem, a izlaganje ksenobioticima može doprineti nastanku bolesti jetre (Schmucker, 2005).

1.7.1.2. Polifenoli kao endokrini ometači

Polifenoli su sposobni da deluju kao fitoestrogeni, odnosno supstance koje se vezuju za nuklearne i/ili membranske ER i deluju kao endogeni estradiol, bilo u pogledu genske ekspresije, bilo po pitanju aktivacije/inhibicije određenih signalnih puteva (Zierau i sar., 2008). Jednom aktivirani jedarni receptori kao dimeri vezuju se za specifične *hormone responsive elements* u promotorskim regionima ciljnih gena i menjaju dinamiku njihove ekspresije, čime se objašnjava širok spektar metaboličkih perturbacija koje izazivaju u eksperimentalnim i epidemiološkim studijama (Heindel i sar., 2017). NAR je slab agonista ER (Harris i sar., 2005), ali je sposoban da deluje kao kompetitivni antagonist u prisustvu potentnih aktivatora ER kao što su estradiol i genistein (Kim i Park, 2013). NAR je sposoban da izazove odgovor iste ili skoro iste magnitude kao nanomolarne koncentracije estradiola (Kuiper i sar., 1998). Hesperetin može da ispolji inhibitoran efekat na aktivnost enzima aromataza (Ye i sar., 2012) ali ne ispoljava estrogensku aktivnost (Kalita i Milligan, 2010).

Ispitivanje ovih supstanci dovodi u pitanje kvalitet procene rizika i evaluacije bezbednosti njihove primene. Čak i kad se potencijalno opasne supstance detektuju i okarakterišu, teško je proceniti dužinu i stepen izlaganja koja dovodi do štetnih efekata kod ljudi. Kada su u pitanju polifenoli, procena je kompleksna ne samo zato što je u pitanju grupa raznovrsnih jedinjenja, već i iz razloga što još nisu razvijene metode precizne evaluacije njihovog dejstva. Tako, merenje koncentracije određenih metabolita polifenola u krvi ili tkivu nije najbolje rešenje zbog intervarijabilne specifičnosti u metabolisanju ovih supstanci. Dodatno, problem predstavlja složenost tehnika za merenje biomarkera, kao i validaciju dobijenih rezultata (Mennen i sar., 2005). Kako su ove supstance još uvek nedovoljno ispitane a imaju potencijalno velike posledice po zdravlje ljudi i ukupan biodiverzitet, potrebno je što detaljnije okarakterisati promene koje nastaju kao posledic njihovog delovanja, naročito u *in vivo* istraživanjima.

Citrusni flavanoni zbog svoje strukturne sličnosti sa endogenim tiroksinom i estradiolom mogu da remete ravnotežu ovih endokrinih osovina tako što utiču na biosintezu hormona i/ili interakciju hormona sa njihovim receptorima i signalnim putevima (Pellegrini i sar., 2014). Supstance koje negativno utiču na transport TH potencijalno dovode do ozbiljnih poremećaja u delovanju TH. Naime, mehanizam kojim se T_3 vezuje za TR ili MCT8 ispoljava neverovatnu sličnost jer se vezuje između sponse

koju čine aminokiseline histidin i arginin, prisutne i kod TR i MCT8 transporterera (Johannes i sar., 2016). Zbog ovakve strukture i organizacije, supstance koje su slične TH mogu da se vežu umesto njih i ispolje inhibitoran efekat. Takav je slučaj sa smešom flavonoida silimarinom, prečišćenim ekstraktom biljke gujina trava (lat. *Silybum marianum*; eng. *Milk thistle*) i njegovim glavnim aktivnim principom, silikristinom, koji zbog svoje strukture i sterne sličnosti sa tiroksinom može da se veže za MCT8 u nanomolarnoj koncentraciji inhibirajući ćelijski transport TH (Johannes i sar., 2016). Takođe, izoflavon genistein zbog sterne sličnosti kompetira sa T₄ za vezivno mesto u TTR, potencijalno povećavajući biodostupnost ovog hormona za ciljna tkiva i organe, a takođe u mikromolarnoj koncentraciji inhibira DIO1 i MCT8 *in vitro* (Braun i Schweizer, 2015).

1.7.1.3. Uticaj citrusnih flavanona na tiroidnu homeostazu

Prva antitiroidna delovanja flavonoida dokazali su Moudgla i sar (1958) kada su pacove hranili flavonoidima oraha, izazvali im strumu i dokazali da flavonoidi inhibiraju biosintezu TH i usvajanje joda. Dodatno, antitiroidni efekti proso koreliraju sa sadržajem flavonoida apigenina i luteolina, koji svoje strumogene efekte ispoljavaju *in vivo*, dok organifikaciju joda inhibiraju *in vitro* (Gaitan i sar., 1989).

Divi i Doerge (1996) su evaluirali efekte različitih flavonoida na inhibiciju TPO. Među najpotentnijim su bili miricetin, kampferol, morin, kvercetin i NAR. Flavonoidi mogu da deaktiviraju TPO kovalentnim vezivanjem za katalitičko mesto enzima ili nekompetitivnom eliminacijom H₂O₂, neophodnog za formiranje jodiranih tirozina (Divi i Doerge, 1996). Ekstrakt *K. brasiliensis* inhibira aktivnost TPO kompetitivnim vezivanjem joda i kuplovanjem H₂O₂ *in vitro* (Ferreira i sar., 2000). Antioksidativne osobine flavonoida mogu da budu razlog inhibicije sinteze TH, imajući u vidu sposobnost flavonoida za uklanjanje H₂O₂.

Inhibicijom TPO raste koncentracija TSH u serumu što dovodi do rasta žlezde i pojave strume. Divi i sar. (1997) su pokazali da su izoflavoni soje, genistein i daidzein, sposobni da blokiraju aktivnost TPO čak i u koncentracijama koje su detektovane u serumu ljudi koji redovno konzumiraju soju. Ovo utiče na prolazno povećanje koncentracije TSH i daidzeina u serumu (Hampl i sar., 2008; dos Santos i sar., 2011). Međutim, važno je napomenuti da efekti citrusnih flavanona na inhibiciju TPO nisu potvrđeni *in vivo*. Chandra i Do (2010) su pokazali da katehini inhibiraju aktivnost

TPO, snižavaju TH i povećaju koncentraciju TSH u serumu. Sličan efekat je pokazan u našoj laboratoriji prilikom administracije niskih doza genisteina i daidzeina u modelu andropauze kod pacova (Šošić-Jurjević i sar., 2010). Međutim, dalja istraživanja su pokazala da su izoflavoni u kompeticiji s T_4 za vezivanje za TTR, zbog čega uzrokuju njegovo uklanjanje sa ovog transportera i povećavaju koncentraciju T_4 u serumu i posleđično ekspresiju T_3 zavisnih gena u jetri i bubrezima (Šošić-Jurjević i sar., 2014). Sintetički flavonoid, EMD21388 i prirodni flavonoidi mogu da inhibiraju aktivnost DIO u jetri (Schroder-van der Elst i sar., 1991; Köhrle, 2000). Ferreira i sar. (2002) su pokazali da flavonoidi inhibiraju aktivnost DIO1, ali s različitim potencijalom. NAR inhibira aktivnost DIO1 *in vivo* (Cody i sar., 1986) a naringin i hesperidin snižavaju koncentraciju T_4 i T_3 u serumu hipertiroidnih pacova (Panda i Kar, 2014). Intenzitet antitiroidnih efekata polifenola zavisi od doze, načina ishrane („*soy-free*“ ishrana kojom se izbegavaju njihovi efekti) kao i starosti životinja (Chang i Doerge, 2000; Schmutzler i sar., 2004; Šošić-Jurjević i sar., 2014).

Flavonoidi takođe interferiraju s TH prilikom vezivanja T_4 za transportni protein ili njihovog ulaska u ćeliju. Köhrle i sar. (1989) su dokazali da sintetički flavonoid F21388 povećava koncentraciju slobodnog T_4 i T_3 tako što zamenjuju T_4 na TTR transporteru. Za razliku od delovanja na TTR, ovaj sintetički flavonoid ne inhibira transport T_3 posredovan MCT8. Ovo sugeriše da ovaj transporter može da razlikuje svoj ligand bolje nego TTR (Kinne i sar., 2010).

In vitro studija Radović i sar. (2006) pokazala je inhibitorni efekat sojinih izoflavona na vezivanje T_4 za TTR u serumu i cerebrospinalnoj tečnosti. Ovaj efekat izoflavoni su ispoljili u mikromolarnoj koncentraciji. Genistein je bio najpotentniji dok su daidzein i glicitein imali slabiji efekat. Ipak, hroničan tretman s 10 mg/kg genisteina i daidzeina ne utiče na njihovu zamenu s T_4 na TTR molekulu u animalnom modelu andropauze (Šošić-Jurjević i sar., 2014), verovatno zbog nanomolarne koncentracije koju ovi izoflavoni dostižu u serumu.

1.7.1.4. Antioksidativna aktivnost citrusnih flavanona

Dejstva citrusnih flavanona na zdravlje potvrđena su brojnim epidemiološkim i animalnim studijama, koje su pokazale da postoji inverzna korelacija između povećanog konzumiranja flavonoida i rizika od kardiovaskularnih bolesti, infarkta mozga i

dijabetesa tipa 2 (Assini i sar., 2013; Mulvihill i sar., 2009). Flavanoni utiču na lipidni metabolizam (Mulvihill i sar., 2016, 2014), povećavaju antioksidativnu zaštitu i inhibiraju peroksidaciju membrane u jetri pacova (Chanet i sar.; 2012).

Antioksidativna aktivnost flavanona zavisi od broja i prostornog rasporeda OH grupa u njihovim molekulima. Dok supstitucija hidroksilne grupe obično smanjuje antioksidativnu aktivnost, adicija OH grupe je povećava (Cai i sar., 2006). Aglikoni i glikozidi poseduju antioksidativne osobine ali su glikozidi zbog konformacije slabijeg potencijala (Kumar i Pandey, 2013). Flavanoni ispoljavaju jaču antioksidativnu aktivnost u hidrofilnoj sredini (Khan i sar., 2014), dok u lipofilnoj HES i hesperidin pokazuju smanjenje antioksidativnog potencijala, a NAR i naringin postaju prooksidansi (Finotti i Di Majo, 2003; de Roos i Duthie, 2015).

Antioksidativna svojstva NAR i HES pokazana su u brojnim animalnim i epidemiološkim studijama (Chanet i sar., 2012; Khan i sar., 2014; Mulhivill i sar., 2009, 2015). Suplementacija citrusnim flavanonima u dozi od 50 – 200 mg/kg dovodi do smanjenja oksidativnog stresa u jetri pacova tretiranih tetraciklinom, doksorubicinom, kao i teškim metalima (Renugadevi i Prabu, 2010; Jain i sar., 2010; Pari i Gnanasoundari, 2006). Potvrđeno je da NAR i HES povećavaju aktivnost antioksidativnih enzima, njihovu gensku i proteinsku ekspresiju (Doré, 2005; Forester i Lambert, 2011; Upadhyay i Dixit, 2015) kao i ekspresiju gena uključenih u kontrolu redoks ravnoteže (Moskaug i sar., 2005). Flavanoni su sposobni da se inkorporiraju u plazma membranu zbog svoje lipofilne prirode i na taj način je zaštite od lipidne peroksidacije (Oteiza i sar., 2005). Sposobni su i da vežu slobodne metale, koji prilikom oksidacije mogu da pokrenu lančanu reakciju nastanka slobodnih radikala (Perron i Brumaghim, 2009; Wang i Brumaghim, 2011).

Kod pacijenata sa hiper-holesterolemijom, -trigliceridemijom i -insulinemijom dolazi do povećanja ekspresije lipogenih gena (Wu i sar., 2013). 3% NAR (200 mg/kg t.m.) normalizuje ekspresiju iRNK *Srebp1-c* i sintezu TG, uz stimulaciju oksidacije masnih kiselina i sprečavanje akumulacije TG *in vivo* (Mulvihill i sar., 2009). Dodatno, konzumiranje 1-2 grejpfruta ili suplementacija s 400 mg/kg NAR dnevno snižava koncentraciju LDL i TG kod ovih pacijenata (Gorinstein i sar., 2004, 2006; Jung i sar., 2003).

Flavanoni modulišu ekspresiju jedarnih receptora uključenih u kontrolu lipidnog metabolizma - NAR je agonista PPAR a antagonist LXR (Goldwasser i sar., 2010). Tretman NAR dovodi do povećanja gensku ekspresiju enzima uključenih u β -oksidaciju masnih kiselina u jetri (Huong i sar., 2006), blokirajući asocijaciju LXR sa njegovim koaktivatorom i ekspresiju njegovog efektorskog gena *Srebp-1c* (Goldwasser i sar., 2010).

Metaboličke studije pokazuju da ishrana bogata mastima i HOL stimuliše proizvodnju VLDL i ApoB kod *Ldl^{-/-}* miševa (Mulvihill i sar., 2009) dok suplementacija NAR i HES favorizuje smanjenje koncentracije ovih molekula. U kulturi hepatocita, flavanoni inhibiraju sekreciju ApoB molekula, glavnog konstituenta LDL (Morin i sar., 2008; Borradaile i sar., 2002; Wilcox i sar., 2001). NAR i HES utiču na smanjenje sekrecije ApoB i povećanje influksa LDL u hepatocite posredstvom LDL-R *in vivo* (Avior i sar., 2013; Akiyama i sar., 2009).

Takođe, nakon ishrane obogaćene holesterolom, 0,1% NAR (20 mg/kg t.m.) i 0,02% HES (4 mg/kg t.m.) smanjuju nivo HOL u plazmi i TG u jetri pacova, smanjenjem aktivnosti enzima 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaze (HMGCR), ključnog enzima u sintezi holesterola i acetil-CoA holesterol aciltransferaze, zaduženog za esterifikaciju holesterola s masnim kiselinama (Kim i sar., 2003; Lee i sar., 1999; Bok i sar., 1999). Uz to, 50 mg/kg NAR i 200 mg/kg hesperidina dnevno sprečavaju fibrozu jetre snižavajući ekspresiju antiinflamatornih gena (Chtourou i sar., 2015; Pérez-Vargas i sar., 2014).

2. CILJEVI

Citrusni flavanoni su bioaktivne supstance koje mogu da deluju blagotvorno u prevenciji metaboličkih oboljenja i uspore proces starenja. Međutim, usled strukturne sličnosti sa TH kao i interferencije sa TPO, ključnim enzimom u biosintezi TH, moguće je da remete ravnotežu ovog endokrinog sistema. Učestalost tiroidnih oboljenja i osetljivost štitaste žlezde na dejstvo ksenobiotika se povećava sa starenjem, dok sposobnost detoksikacije i antioksidativni kapacitet u jetri opadaju. Tiroidni hormoni imaju značajnu ulogu u regulaciji lipidnog metabolizma u jetri.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je utvrditi da li hroničan tretman citrusnim flavanonima naringeninom i hesperetinom utiče na tiroidnu homeostazu i lipidni status u animalnom modelu prirodno ostarelih mužjaka pacova. Realizacija cilja istraživanja podrazumeva utvrđivanje promena u:

- morfofunkcionalnim karakteristikama štitaste žlezde starih mužjaka pacova (24 meseca) u odnosu na mladi adultni uzrast (4 meseca) primenom: stereološke, morfometrijske i ultrastrukturne analize, određivanjem imunohistohemijske ekspresije specifičnih proteina štitaste žlezde kao i koncentracije TSH i ukupnog T₄ u krvi pacova.
- tiroidnoj homeostazi starih mužjaka nakon hroničnog oralnog tretmana naringeninom i hesperetinom, u odnosu na kontrolnu grupu istog starosnog uzrasta tretiranu suncokretovim uljem, evaluacijom gorenavedenih morfofunkcionalnih parametara štitaste žlezde kao i analizom ekspresije T₃ regulisanih gena u jetri.
- lipidnom statusu starih mužjaka nakon hroničnog oralnog tretmana naringeninom i hesperetinom, u odnosu na kontrolnu grupu istog starosnog uzrasta tretiranu suncokretovim uljem, analizom koncentracije lipida i lipoproteina u serumu, strukture jetre i njenih enzima u serumu, kao i određivanjem masnokiselinskog profila fosfolipida u jetri.
- parametrima antioksidativne zaštite starih mužjaka nakon hroničnog oralnog tretmana naringeninom i hesperetinom, u odnosu na kontrolnu grupu istog starosnog uzrasta tretiranu suncokretovim uljem, analizom aktivnosti AO enzima, njihove genske i proteinske ekspresije, redoks ravnoteže i stepena lipidne peroksidacije membrane u jetri.

3.MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Za istraživanja su korišćeni mužjaci pacova *Wistar* soja, odgajani u odgajalištu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. Laboratorijski uslovi su ispunjavali standardne uslove: životinje su boravile u plastičnim kavezima sa prostirkom od sterilne strugotine, pri konstantnoj temperaturi (20-22°C), vlažnosti vazduha i režimu osvetljenja (12h svetlost / 12h mrak), čime je obezbeđen dnevno-noćni ritam. Tokom izvođenja eksperimenta voda i standardna laboratorijska hrana za glodare (Veterinarski zavod Subotica AD, Serbia) su bile dostupne *ad libitum*.

Upotrebu životinja i eksperimentalni protokol odobrio je Etički komitet Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu (rešenje broj 2-12/12).

3.2. Tretmani životinja

Mušjaci pacova *Wistar* soja podeljeni su u pet eksperimentalnih grupa, od po šest životinja (n=6). Prvu grupu činili su mladi adultni, fiziološki intaktni mužjaci starosti četiri meseca (MIKON). Ostale četiri grupe činili su pacovi stari 24 meseca.

Prva grupa starih pacova je fiziološki intaktna kontrola (SIKON). Životinje u drugoj kontrolnoj grupi (KON) su bile tretirane *per os* suncokretovim uljem (0,3 ml; Vital, Serbia). Treća i četvrta grupa životinja bila je tretirana *per os* dozom od 15 mg/kg naringenina (NAR) ili hesperetina (HES) (Sigma Aldrich, MO, USA), suspendovanim u suncokretovom ulju. Životinje su tretirane istim volumenom (0,3 ml) u isto vreme svakog dana tokom četiri nedelje.



Slika 3.1 Eksperimentalne grupe

3.3. Izolovanje organa i priprema seruma

Telesna masa merena je na početku eksperimenta i neposredno pre žrtvovanja. Životinje su žrtvovane brzom dekapitacijom 24h nakon poslednjeg tretmana. Štitaste žlezde su izolovane i jedan njihov lobus i deo jetre su potom korišćeni za histološku analizu primenom svetlosne mikroskopije, dok je drugi lobus štitaste žlezde pripreman za ultrastrukturnu analizu primenom elektronske mikroskopije. Kako bi obezbedili nepristrasnost prilikom izvođenja stereološke metode, konkretan lobus štitaste žlezde koji će se kalupiti u parafinu određivan je metodom slučajnog izbora. Uzorci jetre zamrzavani su trenutno u tečnom azotu i čuvani na -70°C do korišćenja. Ukupna krv je ostavljena na sobnoj temperaturi da se formira ugrušak, a zatim centrifugirana na $900 \times g$, 2×15 min. Serum je skladišten na -70°C radi kasnije upotrebe u biohemijskim i hormonskim analizama.

3.4. Priprema uzoraka za histološku i ultrastrukturnu analizu

3.4.1. Priprema za histološku analizu

Uzorci organa su fiksirani u 4% rastvoru paraformaldehida u fosfatnom puferu (PB), pH 7,4 u trajanju od 24h. Nakon fiksacije, organi su dehidratirani u seriji etanola rastuće koncentracije (30-100%), prosvetljeni u ksilolu i kalupljeni u paraplustu (Histowax, Histowax Product AB, Sweden).

Jedan lobus štitaste žlezde izolovan zajedno sa trahejom serijski je sečen na rotacionom mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Germany) tako da je debljina poprečnog preseka iznosila $5\mu\text{m}$. Reprezentativni preseci jetre sečeni su na debljinu od $5\mu\text{m}$.

3.4.2. Hematoksilin eozin bojenje

Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidratacije preseka u seriji etanola opadajuće koncentracije, preseci su kratko bojani hematoksilinom (ICN Biomedicals Inc., OH, USA), ispirani u česmenskoj vodi pa bojani eozinom (Merck, Germany). Nakon ispiranja u vodi i dehidratacije u seriji etanola rastuće koncentracije, kao i prosvetljavanja u ksilolu, pokrovna stakla su montirana DPX medijumom za montiranje (Sigma-Aldrich, Spain).

3.4.3. Masson trihromatsko bojenje

Nakon deparafinizacije i rehidratacije, preseći su kontrastirani Weigert-ovim hematoksilinom tokom 5 min. Nakon ispiranja česmenskom vodom bojeni su kombinacijom boja (kiseli fuksin i ponceau S, odnos 1:2) tokom 5 min. Nakon ispiranja u destilovanoj vodi, intenzitet obojenosti je nivelisan inkubiranjem preseka u rastvoru fosfomolibdenske i fosfovolframske kiseline (1:1) tokom 10 min. Nakon ovog koraka, preseći su bojeni anilinskim plavim tokom 4 min i potom standarnom, gorenavedenom procedurom montirani DPX medijumom.

3.4.4. Imunohistohemijsko i imunofluorescentno bojenje

Za imunohistohemijsko (IHH) bojenje proteina od interesa na presecima štitastih žlezda korišćena je indirektna IHH ili imunofluorescentna (IF) metoda (Miler i sar., 2014, Šošić-Jurjević i sar., 2015). Analizirana je imunohistohemijska ekspresija sledećih proteina: TPO, Tg, NIS i VEGF i imunofluorescentna ekspresija T₄-Tg.

Ukratko, nakon deparafinizacije i dehidratacije preseći su inkubirani u citratnom puferu pH 6,0 na povišenoj temperaturi u cilju demaskiranja odgovarajućeg antigena, korišćenjem mikrotalasne pećnice. Preseći predviđeni za detekciju TPO i VEGF antigena inkubirani su u mikrotalasnoj pećnici 10 (TPO) i 20 min (VEGF), pri snazi od 750 W, dok je za detekciju NIS inkubiranje trajalo 5 min na 450W. Za IHH detektovanje Tg nije bila neophodna procedura demaskiranja antigena.

Nakon blokiranja endogene peroksidaze, u cilju izbegavanja nespecifične imunoreakcije antitela sa okolnim tkivom, preseći su inkubirani 60 min u normalnom svinjskom serumu (eng. *normal swine serum*; Dako, Denmark) razblaženom u fosfatnom puferu (1:10). Zatim su preseći inkubirani sa primarnim antitelom na humani Tg razblaženim u PBS (120 min / 37°C), dok su primarna antitela na humani TPO, pacovski NIS i humani VEGF inkubirana preko noći na 4°C (Tabela 3.1). Nakon ovog koraka, preseći su ispirani (PBS) i inkubirani u rastvoru odgovarajućeg sekundarnog antitela obeleženog peroksidazom rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP; razblaženim u PBS, 1:100), 60 min / sobna temperatura, potom ispirani PBSom, dok je vizualizacija omogućena primenom hromogenog supstrata za peroksidazu, tečnog rastvora 3,3-diaminobenzidin tetrahidrohlorida (Dako, CA, USA). Preseći su kontrastirani u hematoksilinu, dehidratirani serijom etanola rastuće koncentracije i montirani DPX medijumom za

montiranje histoloških preparata (Sigma-Aldrich, Spain). Specifičnost primarnih antitela potvrđena je izostavljanjem primarnog antitela na drugom preseku iste pločice (negativna kontrola) tokom imunohistohemijske procedure. Sve mikrofotografije su uslikane na DM RB Photomicroscope (Leica, Germany) opremljenim s Leica DFC 320 CCD kamerom. U rezultatima su prikazani reprezentativni preseki tkiva štitaste žlezde.

Tabela 3.1 Primarna i sekundarna antitela korišćena u imunohistohemijskoj analizi

Primarna antitela				
Naziv	Kat. broj	Poreklo	Razblaženje u PBS	Proizvođač
TPO	sc-376876	Miš	1:400	Santa Cruz, Italy
Tg	A0251	Zec	1:500	Dako, Denmark
T₄-Tg	12102	Miš	1:300	Bioscience, USA
NIS	EUD4101	Zec	1:1200	Acris, Germany
VEGF	ab46154	Zec	1:100	Abcam, UK
Sekundarna antitela				
Anti-zečje, obeleženo sa HRP	P0399	Svinja	1:100	Dako, Denmark
Anti-mišje obeleženo sa HRP	Ab6820	Magarac	1:100	Abcam, UK
Anti-mišje, obeleženo sa fluoroforom 488	A21202	Magarac	1:200	Molecular Probes, USA

Prisustvo T₄-Tg u koloidu i folikulskom epitelu štitaste žlezde pacova detektovano je IF bojenjem. Ukratko, deparafinisani i dehidratirani preseki štitaste žlezde inkubirani su u 0,1 M citratnom puferu, pH 6,0 tokom 10 min, pri snazi mikrotalasne pećnice 750 W. Nakon ispiranja u PBS, preseki su inkubirani u rastvoru normalnog seruma magarca (1:10; Dako, Denmark) tokom 60 min na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja

nespecifičnog bojenja preseći su inkubirani sa antitelom za T₄-Tg, u trajanju od 48h na 4°C (Tabela 3.1), zatim isprani u PBS i inkubirani sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa Alexa Flour 488 fluorescentnom bojom u trajanju od 120 min. Preseci su detaljno ispirani u PBS nekoliko puta u toku 60 min, a zatim inkubirani sa enzimom Rnk-azom (1:100), tokom 20 min na 37°C pre kontrastiranja sa propidijum jodidom (PI), koji je korišćen radi definisanja granica folikula. Nakon inkubacije, preseći su ispirani u 2 x slanom natrijum citratnom (SSC) puferu 2 x 5 min, a zatim inkubirani s PI u trajanju od 1,5 min. Nakon ispiranja 4 x 1 min u 2 x SSC i 1 x 5 min u PBS, pokrovna stakla su montirana Moviol 4_88 medijumom za montiranje (Sigma-Aldrich, USA). Rezultati imunofluorescentnog bojenja praćeni su pomoću konfokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa Olympus FV10-ASW (Olympus FLUOVIEW FV1000, Germany). Korišćeni su Ar-ion (488 nm) i HeNe (543 nm) laseri radi pobuđivanja fluorescence. U rezultatima su prikazani reprezentativni preseći tkiva štitaste žlezde.

3.4.5. Priprema za ultrastrukturnu analizu

Iseći štitaste žlezde fiksirani su u 4% rastvoru glutar-aldehida u 0,1 M PB pH 7,4 u trajanju od 24h / 4°C. Nakon ispiranja u PB, tkiva su postfiksirana u 1% rastvoru osmijum tetraoksida (OsO₄) u PB 60 min / 4°C. Nakon ispiranja u dejonizovanoj vodi, tkiva su kontrastirana u 0,5% rastvoru uranil acetata 120 min / 4°C. Potom su uzorci ispirani u dejonizovanoj vodi i dehidratirani u seriji etanola rastuće koncentracije (30-100%). Uzorci su kalupljeni u smeši aralditne smole (Agar Scientific, UK) i učvršćivača (hardener, eng. *dodecyl succinic anhydride*; Agar Scientific, UK).

Kalupi tkiva štitastih žlezda sećeni su dijamantskim nožem (Diatome ultra 45°, Diatome, Switzerland) na tanke preseke debljine 70 nm, na UC7 ultramikrotomu (Leica Microsystems, Germany). Preseci su stavljani na bakarne mrežice, kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom. Snimanje je obavljano na MORGAGNI 268 elektronskom mikroskopu (FEI Company, USA). U rezultatima su prikazani reprezentativni ultratanki preseći tkiva štitaste žlezde.

3.4.6. Stereološka analiza štitaste žlezde

Serijski preseći jednog lobusa štitaste žlezde analizirani su po metodi Miler i sar. (2014), korišćenjem newCAST stereološkog softverskog paketa Visiopharm Integrator System, verzija 3.2.7.0. (Visiopharm, Denmark). Softver je povezan sa Olympus BX-51 mikroskopom koji poseduje integrisanu CCD kameru (PixeLink). NewCast stereološki sistem je generisao interaktivne stereološke mrežice prilikom analize.

3.4.6.1. Određivanje apsolutnog volumena

Apsolutni volumen jednog lobusa štitaste žlezde određivan je primenom Kavalijerijevog principa (Gundersen i Jensen, 1987). Analiziran je svaki 30-ti presek mladih adultnih i svaki 40-ti presek štitastih žlezda starih životinja (obojen hematoksilin eozinom). Na monitoru, pri uvećanju objektiva 4 x, definisan je okvir analiziranog tkiva i generisana je stereološka mrežica 4 x 4. Brojanje pogodaka na određenu histološku fazu unutar okvira analiziranog tkiva vršeno je pri uvećanju objektiva 10x. Volumen štitastih žlezda izračunat je kao zbir pojedinačnih volumena analiziranih faza, pri čemu se volumen faze izračunava po formuli:

$$\bar{V} = a(p) \cdot \bar{d} \cdot \sum_{i=1}^n P_i$$

gde je V volumen štitaste žlezde, $a(p)$ površina koja pripada svakoj tački uzorkovanja, tj. jednom pogotku koji pada na analiziranu fazu, \bar{d} je rastojanje između dva uzastopno analizirana preseka (150 μm u slučaju mladih adultnih ili 200 μm kod starih pacova), $\sum P_i$ je suma pogodaka koji padaju na analiziranu fazu. Uslovi pod kojima se meri definisani su tako da je broj pogodaka na svaku od analiziranih faza bio između 100 i 200.

Volumen štitaste žlezde izračunat je kao zbir volumena folikulskog epitela, volumena intersticijuma i volumena koloida:

$$\bar{V}_{\text{šž}} = \bar{V}_e + \bar{V}_i + \bar{V}_k$$

$V_{\text{šž}}$ - volumen štitaste žlezde, V_e – volumen folikulskog epitela, V_i – volumen intersticijuma, V_k – volumen folikulskog koloida.

3.4.6.2. Određivanje relativne volumenske gustine histoloških faza

Relativna volumenska gustina (V_V) predstavlja procentualnu zastupljenost pojedinačnih faza u ukupnom volumenu organa. Izračunava se kao količnik pogodaka na ispitivanu fazu (epitel, intersticijum ili koloid) i ukupnog broja pogodaka (zbir pogodaka na epitel, intersticijum i koloid). Dobijeni količnik se množi brojem 100. Volumenska gustina se izražava u procentima (%) i predstavlja relativnu, bezdimenzionu stereološku veličinu.

$$V_V = \frac{V_{(faze)}}{V_{\check{s}z}} \cdot 100$$

V_V – Relativna volumenska gustina, $V_{(faze)}$ – volumen epitela, intersticijuma ili koloida, $V_{\check{s}z}$ – volumen štitaste žlezde

3.4.7. Određivanje relativne volumenske gustine epitela imunopozitivnog na Na^+/I kotransporter

Relativna volumenska gustina NIS-imunopozitivnog epitela rađena je po metodi opisanoj u radu Miler i sar. (2014). Ukratko, pri uvećanju objektiva 10 x i generisanom mrežicom 4 x 4, V_V NIS-imunopozitivnog epitela ($V_{\text{imunopozitivni epitel}}$) je određena kao relativni odnos zbira pogodaka koji padaju na bazolateralnu membranu ($V_{\text{imunopozitivna bazolateralna membrana}}$) i citoplazmu ($V_{\text{imunopozitivna citoplazma}}$) tirocita, podeljenog sa ukupnim zbirom pogodaka koji padaju na epitel, intersticijum i koloid, odnosno volumen štitaste žlezde ($V_{\check{s}z}$). Vrednosti su pomnožene sa 100 i izražene su u procentima (%).

$$V_{\text{imunopozitivni epitel}} = \frac{V_{\text{imunopozitivna bazolateralna membrana}} + V_{\text{imunopozitivna citoplazma}}}{V_{\check{s}z}}$$

$V_{\text{imunopozitivni epitel}}$ – pogoci koji padaju na NIS-imunopozitivni epitel, $V_{\text{imunopozitivna bazolateralna membrana}}$ – pogoci koji padaju na NIS-imunopozitivnu bazolateralnu membranu tirocita, $V_{\text{imunopozitivna citoplazma}}$ - pogoci koji padaju na NIS-imunopozitivnu citoplazmu, $V_{\check{s}z}$ – volumen štitaste žlezde.

3.4.8. Kvantitativna analiza imunofluorescentnog signala tiroksina vezanog za tiroglobulin

Merenje relativnog intenziteta fluorescence (RIF) određivano je pomoću programa ImageJ v.1.49 (NIH, MD, USA), po proceduri objavljenoj u radu Gak i sar. (2015). RIF je određivan na osnovu rezultata dobijenih: merenjem pojedinačnih vrednosti za integrativnu gustinu na 50 T₄-Tg IF-pozitivnih folikula po životinji od koje je oduzimana vrednost proizvoda srednje vrednosti fluoresciranja pozadine (tri imunonegativna mesta u neposrednoj blizini merenog IF-pozitivnog folikula su takođe opisana u cilju merenja srednje vrednosti fluorescence pozadine, *background*) i površine opisanih folikula. Vrednosti su množene sa 100 i izražavane u procentima (%).

$$\text{RIF} = \text{ID} - (\text{CA} \times \text{MB})$$

RIF – relativni intenzitet fluorescence, ID – integrativna gustina, CA – površina opisanih folikula, MB – srednja vrednost fluorescence pozadine.

3.5. Izolacija RNK, reverzna transkripcija i reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

3.5.1. Izolacija RNK

Ukupna RNK iz jetre (50 mg) izolovana je korišćenjem TRIzol[®] reagensa (Life Technologies, USA). Ukratko, zamrznuto tkivo homogenizovano je u 0,5 ml TRIzol[®] reagensa na 4°C. U homogenizovano tkivo je dodavan 0,1 ml hloroforma. Nakon centrifugiranja 12000 x g 20 min / 4°C u mikrotubama su se jasno izdvaja tri sloja: gornja vodena faza u kojoj se nalazila RNK, međufaza sa proteinima i lipidima, i donja faza u kojoj je DNK. Vodena faza je prenošena u nove sterilne mikrotube. RNK je precipitirana dodavanjem 0,25 ml hladnog izopropanola, nakon čega su mikrotube inkubirane 10 min na 4°C. Nakon centrifugiranja (12000 x g, 20 min / 4°C) odlivan je supernatant, a talog RNK je ispiran u 0,5 ml 75% etanola, resuspendovan i potom dva puta centrifugiran (7500 x g, 5 min / 4°C). Talog RNK je sušen na sobnoj temperaturi pa finalno rastvaran u 130 µl dietilpirokarbonata (DEPC; 0,1 ml DEPC u 100 ml dejonizovane vode) vode i zamrzavan na -70°C do daljeg korišćenja.

Koncentracija RNK je merena na spektrofotometru (Biophotometer, Eppendorf, Germany). Za određivanje čistoće uzorka i eventualne kontaminacije proteinima

korišćen je odnos apsorbanci na 260 nm i 280 nm. Odnos A260/A280 > 1.8 smatran je zadovoljavajućim, odnosno ukazivao je da nije došlo do kontaminacije uzoraka izolovane RNK.

3.5.2. Reverzna transkripcija

Izolovani molekuli RNK su prevođeni u komplementarnu DNK (cDNK) reakcijom reverzne transkripcije (RT), korišćenjem aparata 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, MA, USA). Za prevođenje RNK u cDNK korišćen je kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, USA) koji se sastojao od: nasumičnih heksamernih prajmera, 100 mM rastvora sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, po 2 mM ATP, TTP, GTP i CTP), pufera za reverznu transkripciju, enzima reverzne transkriptaze i inhibitora RNaze. Reakciona smeša (20 µl) se sastojala od 10 µl uzorka (3 µg RNK rastvorene u DEPC vodi), 2 µl pufera za reverznu transkripciju, 0,8 µl rastvora dezoksiribonukleotid-trifostata, 2 µl nasumičnih prajmera, po 1 µl enzima reverzne transkriptaze i inhibitora RNKaze, kao i 3,2 µl DEPC vode. Uzorci su inkubirani na 25°C u trajanju od 10 min a zatim na 37°C, temperaturi optimalnoj za funkcionisanje reverzne transkriptaze, u trajanju od 120 min. Reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka tokom 5 min na 85°C, temperaturi na kojoj dolazi do inaktivacije ovog enzima i razdvajanja sintetisanih lanaca cDNK. Uzorci cDNK čuvani su na -20°C do dalje upotrebe.

3.5.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Za kvantitativnu analizu nivoa ekspresije ispitivanih gena korišćena je reakcija lančanog umnožavanja pomoću polimeraze u realnom vremenu (eng. „*real-time*“ *polimerase chain reaction*, qPCR) metod, korišćenjem aparata za qPCR ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, CA, USA).

Radi izbora odgovarajućih endogenih kontrola (gena koji se konstitutivno ekspimiraju u tkivu; eng. *housekeeping genes*), urađena je optimizacija PCR reakcije i validacija svih korišćenih prajmera, prikazanih u Tabeli 3.2. Validacija prajmera endogenih kontrola podrazumevala je izračunavanje stabilnosti njihove genske ekspresije i efikasnost amplifikacije u odnosu na gene od interesa. Endogene kontrole korišćene u procesu validacije su: hipoksantin fosforiboziltransferaza (eng. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*, *Hprt*), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (eng.

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Gapdh), beta aktin (β -aktin), *Ciklofilin A* i *18S rRНК*.

U ovoj doktorskoj disertaciji analizirani su geni regulisani trijodtironinom: *Dio1*, *Thrsp*, *Lxr*, *Fas*, *Fat*. Osim njih, analizirani su geni koji kodiraju iRNK antioksidativnih enzima: *Sod 1* i *2*, *Cat*, *Gpx* i *Gr*.

Upoređivanjem relativne genske ekspresije trijodtironinom regulisanih gena i gena enzima AOS u odnosu na sve navedene endogene kontrole (validacija prajmera) dobijeni su slični rezultati; pa ipak, *Hprt* je pokazao najkonzistentniju ekspresiju u slučaju gena regulisanih trijodtironinom, dok se *Gapdh*, pokazao najkonzistentnijim u slučaju gena enzima AOS, te su ova dva gena izabrana za endogene kontrole.

Za qPCR korišćena je mikrotitarska ploča sa 96 mesta za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, CA, USA). Sve reakcije rađene su u duplikatu. Reakciona smeša (10 μ l) sastojala se od: 6 μ l SYBR Green PCR Master miksa (fluorescentna boja SYBR Green, enzim AmliTaq Gold DNK polimeraze i smeše dezoksioligonukleotida, dNTP), po 0,5 μ l specifičnih prajmera (finalna koncentracija prajmera 500 nM) za gen od interesa ili za endogenu kontrolu i 4 μ l odgovarajućeg uzorka cDNK. Uslovi PCR reakcije bili su sledeći: 3 min na 95°C, 40 ciklusa od po: 15 sec na 95°C za početnu denaturaciju lanaca, 30 sec na 60°C i 30 sec na 72°C za vezivanje prajmera, odnosno elongaciju lanaca. Po završenom umnožavanju se postepeno snižavala temperatura termo bloka, pri čemu se smanjivan intenzitet fluorescencije, što odgovara disocijaciji nastalog proizvoda. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski softver 7500 System software (Applied Biosystems, CA, USA). Nivo ekspresije ispitivanog gena određen je u odnosu na ekspresiju endogene kontrole (*Gapdh* za enzime AOS, *Hprt* za T₃-zavisne gene), detektovane u istom uzorku i iskazane kao $2^{-\Delta Ct}$, gde je ΔCt razlika između Ct vrednosti (eng. *cycle threshold*) gena od interesa i endogene kontrole. DEPC voda je nanošena umesto cDNK sa svim ostalim komponentama reakcione smeše i služila je kao negativna kontrola.

Tabela 3.2 Setovi prajmera.

GEN	SEKVENCA PRAJMERA	PRISTUPNI BROJ U BAZI PODATAKA
<i>Dio 1</i>	f: 5'-fTTTAAGAACAACGTGGACATCAGG-3' r: 5'-GGTTTACCCTTGTAGCAGATCCT-3'	NM_021653.4
<i>Thrsp</i>	r: 5'-CATCGTCTTCCCTCTCGTGT-3' f: 5'-GTCCTCTGATGGTCAAAGTC-3'	NM_001007721.1
<i>Lxr</i>	r: 5'-TCATTAGCATCCGTCCGAACA-3' f: 5'-TCAGCATCTTCTCTGCAGACCGG-3'	NM_031627.2
<i>Fas</i>	f: 5'- TGGATCCATGGCAGCTGTTG-3' r: 5'- TCATTCACTGCAGCCTGAGGTC-3'	NM_017332.1
<i>Fat</i>	f: 5'- AATGAGCCCAACAGTTCCGA-3' r: 5'- GAATTAAGTTGAAACCAGGCCACA-3'	NM_031561.2
<i>Sod1</i>	f: 5'-AAGCGGTGAACCAGTTGTG-3' r: 5'-CCAGGTCTCCAACATGCC-3'	NM_017050.1
<i>Sod2</i>	f: 5'-GGTGGAGAACCCAAAGGAGA-3' r: 5'-AGCAGTGGAATAAGGCCTGT-3'	NM_017051.2
<i>Cat</i>	f: 5'-CCAGCGACCAGATGAAGCA-3' r: 5'-TGGTCAGGACATCGGGTTTC-3'	NM_012520.2
<i>Gpx</i>	f: 5'-TATAGAAGCCCTGCTGTCCA-3' r: 5'-CAAGCCCAGATACCAGGAA-3'	NM_030826.4
<i>Gr</i>	f: 5'-ACGAGGAAGACGAAATGCGTGATG-3' r: 5'-AGGATGAATGGCGACGCTATTGTC-3'	NM_053906.2
<i>Hprt</i>	f: 5'-TTATGGACAGGACTGAAAGACTTG-3' r: 5'-CAGCAGGTCAGCAAAGAACTTATA-3'	NM_012583.2
<i>Gapdh</i>	f: 5'-GTGGACCTCATGGCCTACAT-3' r: 5'-GGATGGAATTGTGAGGGAGA-3'	NM_017008.4

3.6. Analiza koncentracije hormona u krvnom serumu

3.6.1. Određivanje koncentracije ukupnog tiroksina u krvnom serumu

Koncentracija ukupnog T₄ merena je pacovskim ELISA esejem (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*; CUSABIO, Kina), zasnovanim na metodi kompetitivne inhibicije. Naime, za mikrotitarsku ploču je vezano primarno antitelo specifično za T₄, za koje se kompetitivno vezuju T₄ iz nanesenih uzoraka (poznate ili nepoznate koncentracije) i T₄ konjugovan sa biotinom. Standardi poznate koncentracije T₄ i uzorci seruma pacova nepoznate koncentracije inkubirani su avidinom konjugovanim sa HRP. Nakon ispiranja, dodavani su supstrati A i B pri čemu se razvijala boja čiji intenzitet je obrnuto proporcionalan koncentraciji hormona u uzorku. Dodavanjem rastvora za zaustavljanje reakcije prekidalo se dalje razvijanje boje, a apsorbancija rastvora spektrofotometrijski je merena na 450 nm, koristeći automatski ELISA čitač za mikrotitarske ploče (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finland). Na osnovu dobijenih vrednosti konstruisana je 4PL kriva (eng. 4-parameter logistic curve, Prism, GraphPad Software, Inc.) iz koje su očitavane nepoznate vrednosti koncentracija T₄ iz uzoraka seruma eksperimentalnih životinja. Koncentracija ukupnog T₄ u serumu izražavana je u ng/ml. Merni opseg kita bio je 20-320 ng/ml, dok je koeficijent varijacije unutar eseja bio < 15%.

3.6.2. Određivanje koncentracije tirostimulirajućeg hormona u krvnom serumu

Koncentracija TSH određivana je korišćenjem komercijalno dostupnog pacovskog sendvič ELISA eseja (IBL ELISA Kit, Nemačka). Za mikrotitarsku ploču vezana su monoklonska antitela specifična za TSH. Standardi poznatih koncentracija i uzorci seruma nepoznate koncentracije TSH inkubirani su sa anti-TSH monoklonskim antitelima. Nakon toga su dodavana sekundarna poliklonska antitela konjugovana sa HRP. Posle ispiranja dodavan je supstrat 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidin (TMB), koji se konvertovao u plavo obojeni proizvod. Enzimski reakcija je prekidana dodavanjem hlorovodonične kiseline, čime se plava boja menjala u žutu. Intenzitet boje bio je direktno proporcionalan koncentraciji TSH u uzorcima. Apsorbanca je merena na 450 nm i 600 nm na ELISA čitaču (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation,

Finland). Koncentracija TSH u serumu izražavana je u ng/ml. Merni opseg eseja bio je 0,85-3,23 ng/ml, a koeficijent varijacije unutar eseja je iznosio < 8.8%.

3.7. Analiza biohemijskih parametra u krvnom serumu

Za određivanje biohemijskih parametara u krvnom serumu korišćeni su komercijalno dostupni kolorimetrijski eseji. Vrednosti apsorbance očitavane su na Roche/Hitachi cobas c 501 sistemu.

3.7.1. Određivanje koncentracije alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze i γ -glutamilttransferaze u krvnom serumu

Određivanje koncentracije ALT zasniva se na reakciji između L-alanina i 2-oksoglutarata koju katalizuje ALT. U prisustvu laktat dehidrogenaze dolazi do redukcije piruvata uz pomoć NADH i kao proizvod se formiraju L-laktat i NAD^+ . Piridoksal fosfat u ovom eseju služi kao koenzim u reakciji transfera amino grupe. Step en oksidacije NADH je direktno proporcionalan katalitičkoj aktivnosti ALT u ispitivanom uzorku. Koncentracija ALT je izražavana u U/L. Merni opseg eseja bio je 5-7000 U/L, dok je koeficijent varijacije unutar eseja bio < 1.3%.

U uzorku, AST katalizuje transfer amino grupe između L-aspartata i 2-oksoglutarata, pri čemu dolazi do formiranja oksalacetata i L-glutamata. U prisustvu malat dehidrogenaze oksalacetat reaguje sa NADH i formira se NAD^+ . Piridoksal fosfat služi kao koenzim i obezbeđuje potpunu aktivaciju enzima. Katalitička aktivnost AST je direktno proporcionalna stepenu oksidacije NADH u serumu ispitivanih uzoraka. Koncentracija AST je izražavana je u U/L. Merni opseg eseja bio je 5-7000 U/L, dok je koeficijent varijacije unutar eseja bio < 1.3%.

Esej za određivanje koncentracije GGT se zasniva na prenosu γ -glutamil grupe sa L- γ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilida na glicilglicin. Količina oslobođenog 5-amino-2-nitrobenzoata je proporcionalna aktivnosti GGT u uzorku. Koncentracija GGT je izražavana u U/L. Merni opseg eseja bio je 3-13200 U/L, dok je koeficijent varijacije unutar eseja bio < 0.9%.

3.7.2. Određivanje koncentracije holesterola u krvnom serumu

Esej za određivanje koncentracije ukupnog holesterola zasniva se na svojstvu da estri holesterola hidrolizuju u prisustvu holesterol esteraza pri čemu nastaju holesterol i

masne kiseline. Holesterol oksidaza tada oksiduje holesterol do holest-4-en-3-ona i vodonik peroksida. U prisustvu peroksidaza nastali vodonik peroksid utiče na oksidativno vezivanje fenola i 4-aminofenazona stvarajući kinon-imin crvene boje. Intenzitet boje je direktno proporcionalan koncentraciji holesterola. Koncentracija ukupnog holesterola je izražavana u mM/L. Merni opseg eseja iznosio je 0,1-20,7 mM/L, dok je koeficijent varijacije unutar eseja bio < 1,1%.

U prisustvu magnezijumovih jona, dekstran sulfan selektivno formira komplekse sa LDL, VLDL i hilomikronima. Ovi kompleksi rastvorljivi u vodi su otporni na enzime modifikovane sa polietilen glikolom (PEG). Koncentracija HDL je direktno enzimski određivana uz pomoć holesterol esteraza i oksidaza konjugovanih s PEG do formiranja amino grupa. Holesterol estri kvantitativno hidrolizuju delovanjem holesterol esteraze stvarajući slobodan holesterol i masne kiseline. Holesterol u prisustvu kiseonika i holesterol oksidaze oksiduje do Δ^4 -holestenona i vodonik peroksida. U prisustvu peroksidaza, vodonik peroksid reaguje sa 4-amino-antipirinom i natrijum N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksianilinom, pri čemu se formira plavo-ljubičasta boja. Koncentracija holesterola je direktno proporcionalna intenzitetu boje. Koncentracija HDL holesterola je izražavana u mM/L. Merni opseg bio je od 0,08-3,12 mM/L, dok je koeficijent varijacije unutar eseja bio < 0,4%.

Koncentracija LDL holesterola određivana je indirektno, korišćenjem Friedewald-ove formule (Friedewald, 1972):

$$\text{LDL} = \text{TC} - \text{HDL} - \text{TG} / 2,2 \text{ [mM/L]}$$

LDL – lipoproteini male gustine, TC – ukupni holesterol, TG – ukupni trigliceridi, HDL – lipoproteini velike gustine.

3.7.3. Određivanje koncentracije triglicerida u krvnom serumu

Metoda se zasniva na korišćenju lipoprotein lipaze koja brzo i u potpunosti hidrolizuje trigliceride do glicerola, uz oksidaciju dihidroaceton fosfata i vodonik peroksida. Nastali vodonik peroksid usled delovanja peroksidaza reaguje s 4-aminofenazonom i 4-hlorfenolom, pri čemu se formira crveno obojeni proizvod (Tinderova reakcija). Intenzitet obojenosti rastvora je direktno proporcionalan koncentraciji triglicerida. Koncentracija ukupnih triglicerida izražavana je u mM/L. Merni opseg eseja iznosio je 0,1-10 mM/L, dok je koeficijent varijacije unutar eseja bio < 0,9%.

3.8. Analiza profila masnih kiselina u fosfolipidima membrane hepatocita jetre

3.8.1. Izolacija ukupnih lipida jetre

Za analizu ukupnih lipida homogenizovano je 200 mg jetre u 2 ml Tris-saharoznog pufera, 90 sec / sobna temperatura. Potom je usledila sonifikacija 5 x 5 sec ručnim sonifikatorom, na 30 KHz / sobna temperatura (Bandelin, Nemačka). Sonifikat je prebacivan u staklene epruvete uz dodatak 2 ml metanol : hloroforma (M:H; 2:1) i 50 mg antioksidanta 2,6-bi-tercbutil-hidroksi-toluena (BHT). Nakon vorteksovanja u rastvor je dodavano 7 ml M:H sa BHT te je smeša ponovo vorteksovana. Uzorci su sonifikovani 30 min u ultrazvučnom kupatilu, na 59 KHz / sobna temperatura. Nakon sonifikacije i pauze u trajanju od 30 min uzorci su vorteksovani, pa je ponovljen korak sonifikacije u ultrazvučnom kupatilu pod istim uslovima kao u prethodnom koraku. Nakon toga, uzorci su filtrirani i u njih je dodavano 15 ml M:H rastvarača. Uzorci su potom uparavani u vakuum uparivaču na temperaturi od 50°C i resuspendovani u 10 ml M:H i 2 ml destilovane vode, prenošeni u nove epruvete i vorteksovani, nakon čega su inkubirani preko noći na 4°C. Sledećeg dana, uzorci su centrifugirani na 400 x g 10 min / sobna temperatura, vodena faza je odlivana, dodavano je 1,5 ml destilovane vode, pa su uzorci ponovo centrifugirani pod istim uslovima. Nakon ponovnog odlivanja vodene faze, uzorci su upareni u vakuum uparivaču nakon čega im je sukcesivno dodavano po 2 ml metanola, acetona i etanol benzol smeše (1:1). Nakon svakog dodavanja rastvarača, uzorci su upareni do suva. Finalno, uzorci su rastvarani u 200 µl M:H.

3.8.2. Razdvajanje lipidnih klasa tankoslojnom hromatografijom

Korišćenjem jednodimenzione tankoslojne hromatografije na silikagelu, razdvajani su fosfolipidi jetre (Ristić, 1991). Debljina silikagela iznosila je 0,5 mm. Totalni lipidni ekstrakt nanošen je na ploču u vidu linije dužine oko 3 cm, na visini 2 cm od donje ivice ploče, koja je aktivirana na 110 °C u trajanju od 60 min. Za razdvajanje frakcija lipida korišćena je smeša petroleter-dietiletar-sirćetne kiseline (87:12:1, v/v/v). Razdvojene frakcije lipida identifikovane su pod svetlošću UV lampe.

3.8.3. Metilovanje masnih kiselina

Masne kiseline su esterifikovane po modifikovanoj metodi transesterifikacije Christopherson i Glass (1969). U frakciju fosfolipida izdvojenih sa odgovarajućeg sloja silikagela dodavano je 1,5 ml n-heksana. Posle vorteksovanja, dodavano je 0,2 ml 2 M NaOH u metanolu. Uzorci su inkubirani na 85°C jedan sat. Posle inkubacije, u hidrolizat je dodavano 0,2 ml 1 M H₂SO₄ u metanolu, nakon čega su uzorci ponovo inkubirani na 85°C tokom 120 min. Nakon hlađenja, smeša je centrifugirana na 900 x g 10 min / sobna temperatura, nakon čega je heksanski sloj uparen do suva u struji azota.

3.8.4. Analiza masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom

Analiza masnih kiselina fosfolipida je obavljena gasno-tečnom hromatografijom na gasnom hromatografu Shimadzu GC 2014 sa plamenjonizacionim detektorom na Rtx 2330 koloni (dimenzija 60 m x 0,25 mmID, debljina 0,2 µm; Restek, PA, USA). Izvedena analiza zahtevala je protok helijuma kao nosećeg gasa (5 ml / min), vazduha (320 ml / min) i vodonika (30 ml / min). Temperatura detektora i injektora je podešena na 260°C, odnosno na 220°C. Nakon 50 minuta postignuto je adekvatno razdvajanje, pri čemu se temperatura kolone kretala od 140°C (5 min) do 220°C, brzinom 3°C / min (20 min). Standard masnih kiselina je korišćen prilikom identifikacija metil-estara masnih kiselina. Sadržaji pojedinačnih masnih kiselina (C16:0 do C22:6 n-3) izražavani su u procentima od ukupno detektovanih masnih kiselina na osnovu površine njihovih pikova.

Sadržaj ukupnih SFA određivan je kao zbir relativnih sadržaja C16:0 i C18:0 masnih kiselina, zastupljenost ukupnih MUFA izračunavan je kao zbir relativnih sadržaja C16:1n-7, C18:1n-9 i C18:1n-7, a sadržaj PUFA predstavljan je zbirom pojedinačnih sadržaja C18:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6, C20:5n-3, C22:5n-3 i C22:6n-3. Sadržaj n-3 i n-6 PUFA izražavan je zbirom pojedinačnih PUFA u zavisnosti od položaja nezasićene veze.

3.9. Izolacija ukupnih proteina i Western blot analiza

3.9.1. Izolacija ukupnih proteina jetre

Odmrznuto tkivo jetre (50mg) je homogenizovano u saharoznom puferu koji je sadržao 0,25 M saharoze, 0,05 M Trisa, 1 mM EDTA, pH 7,4 u odnosu 1:10. Tkiva su homogenizovana u ultraturaks homogenizeru (nem. Ultra-Turrax, T-25; Janke and Kunkel, Germany), nakon čega su sonifikovana ručnim sonifikatorom (Bandelin, Germany) 3 x 15 sec na frekvenciji od 30 KHz. Uzorci su potom centrifugirani na 20800 x g 20 min / 4°C. Posle centrifugiranja, odvajanje supernatant koji sadržao ukupne proteine ćelijskog ekstrakta i zamrzavanje na -20°C do korišćenja.

Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima jetre određivana je Lorijevom metodom (Lowry i sar., 1951). U 20 µl 10 x razblaženog uzoraka dodavano je 300 µl rastvora 2% Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH, 1% CuSO₄ x 5 H₂O i 2% K-Na-tartarat u H₂O (98:1:1). Nakon inkubacije od 15 min /sobna temperatura, uzorcima je dodavano 60 µl fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa (Folin-Ciocalteu reagens), koji je bio 5 x razblažen u destilovanoj vodi. Uzorci su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi uz povremeno vorteksovanje. Apsorbanca uzoraka merena je na 670 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče (Micro Plate Reader, GDV, Italy).

Koncentracija proteina očitavana je iz standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbance standarda, albumina seruma govečeta (eng. *bovine serum albumine*, BSA), u opsegu koncentracija 0,1-1 mg/ml u destilovanoj vodi. Koncentracija proteina izražavana je u mg/ml.

3.9.2. Elektroforeza proteina

Proteini su razdvajani na osnovu razlika u molekulskim masama metodom denaturišuće natrijum-dodecilsulfat-poliakrilamid gel elektroforeze (eng. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE), po modifikovanoj metodi Lemlija (Laemmli, 1970), na aparatu Minigel-Twin (Biometra GmbH, Germany).

Uzorci jetre su pripremani kuvanjem 5 min na 100°C, u jednakoj zapremini pufera za uzorke (Laemli pufer). Proteini su razdvajani na 12% gelu u trajanju od 90 min i pri konstantnom naponu od 120 V. Na gelove je nanošen molekulski marker, odnosno smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10-170 kDa; Fermentas, Lithuania).

3.9.3. Imunoblot

Nakon elektroforetskog razdvajanja proteina izvršen je prenos sa poliakrilamidnog gela na polivinilidien fluorid (PVDF) membranu i njihovu detekciju pomoću specifičnih primarnih i sekundarnih antitela.

Nakon završene elektroforeze sledio je transfer na PVDF membrane (Immobilon-FL, veličine pora 0,45 μm ; Millipore Corporation, Italy). Transfer je vršen korišćenjem polusuvog sistema za transfer Fastblot B43 (Biometra, Germany) na 5 mA/cm².

Nespecifično vezivanje proteina na membranama blokirano je inkubiranjem u puferu za blokiranje (5% BSA i 0,05% Tween-20 u PBS) u trajanju od 60 min na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Membrane su inkubirane sa odgovarajućim razblaženjem primarnog antitela koje se specifično vezuje za proteine od interesa (Tabela 3.3), rastvorenim u 1% BSA u PBS sa 0,05% Tween-20, preko noći na 4°C (Tabela 3.3). Nakon inkubacije, višak primarnog antitela je ispran u PBS, a membrane su potom inkubirane sa odgovarajućim razblaženjem sekundarnog antitela (Tabela 3.3) 60 min na sobnoj temperaturi.

Tabela 3.3 Primarna i sekundarna antitela korišćena u imunoblot analizi.

Primarna antitela				
Naziv	Kat. broj	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
β-Aktin	ab8227	Zec	1:5000	Abcam, UK
SOD1	ab13498			
SOD2	ab13533			
CAT	ab16731		1:2000	
GPx	ab22604			
GR	ab16801			
Sekundarna antitela				
Anti-zečji, obeležen s HRP	sc-2313	Magarac	1:5000	Santa Cruz, Italy

Za vizuelizaciju imunopozitivnih traka, membrane su 3 min inkubirane sa hemiluminiscentnim supstratom luminolom, uz dodatak H₂O₂. Kvantifikacija relativne optičke gustine imunopozitivnih proteinskih traka na membranama određivana je

denzitometrijskim metodom, upotrebom programa ImageJ v.1.49 (NIH, MD, USA). Intenzitet svake trake normalizovan je prema intenzitetu imunopozitivnosti trake β -aktina.

3.10. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

3.10.1. Priprema uzoraka za određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

Za pripremu uzoraka za određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima, 200 mg tkiva jetre je homogenizovano u saharoznom puferu i uzorci su pripremljeni pa centrifugirani na 105000 x g, u trajanju od 90 min. Nakon centrifugiranja uzorci su zamrzavani na -70°C do korišćenja. Koncentracija proteina u uzorku određivana je korišćenjem Lorijeve metode i izražavana je u mg/ml. Sva spektrofotometrijska merenja rađena su u duplikatu na spektrofotometru Shimadzu UV-160 (Shimadzu Scientific Instruments, Shimadzu Corporation, Japan)

3.10.2. Određivanje aktivnosti ukupne superoksid dismutaze

SOD je enzim koji katalizuje reakciju O^{2-} do H_2O_2 ili molekuskog kiseonika (O_2). Aktivnost SOD je određivana adrenalinskom metodom (Misra i Fridovich, 1972). Prisutna SOD uklanja O^{2-} pri čemu inhibira reakciju autooksidacije adrenalina. Promenom apsorbancije na 480 nm meri se brzina autooksidacije adrenalina. Porast apsorbance na ovoj talasnoj dužini potiče od akumulacije adrenohroma. Brzina autooksidacije adrenalina ekvivalentna je nagibu linearnog dela porasta apsorbance, a procenat inhibicije se koristi kao mera katalitičke aktivnosti enzima. Brzina autooksidacije adrenalina u odsustvu enzima prati se spektrofotometrijski i uzima se kao referentna (kontrolna) reakcija, a brzina autooksidacije u prisustvu uzorka, odnosno SOD, predstavlja deo referentne reakcije.

U reakcionu smešu koju čine 3 ml karbonatnog pufera, pH 10,2 i 3×10^{-4} M rastvor adrenalina u 0.1 M HCl, dodat je uzorak u količini dovoljnoj da redukuje linearni deo krive autooksidacije adrenalina za 30-40%. Količina uzorka treba da bude tolika da promena apsorbance u minuti ($\Delta A/\text{min}$) tokom autooksidacije u linearnom delu bude 0,02-0,022. Autooksidacija adrenalina praćena je tokom četiri minuta na 480 nm. Reakcija je stabilna na temperaturi između 26-30°C. Paralelno je rađena i kontrolna reakcija. Za izračunavanje SOD aktivnosti korišćen je procenat inhibicije autooksidacije

adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju autooksidacije adrenalina.

Količina prisutnog SOD u uzorku izražavana je u jedinicama SOD aktivnosti po mg proteina (U/mg proteina). Jedinica SOD aktivnosti definisana je kao količina proteina koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorbance.

$$\text{SOD Aktivnost} = \frac{(\Delta K - \Delta A) \cdot 2 \cdot R}{V \cdot C_{pr} \cdot \Delta K}$$

ΔK – promena apsorbance kontrolne reakcije u minuti, ΔA – promena apsorbance reakcije sa uzorkom u minuti, V – zapremina uzorka koji se sipa u rekcionu smešu, C_{pr} – koncentracija proteina (mg/ml), R – razblaženje.

3.10.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza 1 i 2

Princip metode je isti kao i gorepomenuti, s tom razlikom što je za izračunavanje aktivnosti SOD2 potrebno blokirati aktivnost SOD1. To je postignuto dodavanjem 8 mM KCN u odnosu 1:1 i inkubacijom od 30 min pre početka analize. Takođe, u ovom slučaju dodavana je veća količina uzorka jer SOD2 čini svega 5-10% ukupne aktivnosti SOD. Izračunavanje aktivnosti enzima je isto kao i za ukupnu SOD aktivnost.

Aktivnost SOD1 dobijeno je tako što je od ukupne SOD aktivnosti oduzeta aktivnost SOD2.

3.10.4. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT određivana je metodom po Kleibornu (Claiborn, 1984). Aktivnost CAT je merena praćenjem razlaganja H_2O_2 , odnosno praćenjem pada apsorbance pri datoj talasnoj dužini, pri čemu je poznato da vodonik peroksid ima maksimum apsorbance na 240 nm. Za slepu probu je korišćen fosfatni pufer bez H_2O_2 . Količina prisutne CAT u uzorku izražavana je u jedinicama CAT aktivnosti po mg proteina (U/mg proteina).

Tokom merenja, praćen je pad apsorbance u roku od 3 min (5 merenja na po 30 sec). Srednja vrednost promena apsorbance treba da bude u opsegu 0,03-0,06.

$$\text{CAT Aktivnost} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{bl}}) \cdot 1000 \cdot V_{\text{rs}} \cdot R}{43,6 \cdot V_{\text{uz}} \cdot C_{\text{pr}}}$$

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{bl} - srednja promena apsorbance slepe probe u minuti, V_{rs} - zapremina reakcione smese (ml), R - razblaženje, C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml), V_{uz} - zapremina uzorka (ml), 43,6 - molarni ekstinkcioni koeficijent za H_2O_2 na 240 nm ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

3.10.5. Određivanje aktivnosti glutathion-peroksidaze

Aktivnost GPx određivana je modifikovanom metodom Paglie i Valentina (1967). Metod je zasnovan na osobini GPx da katalizuje oksidaciju GSH u GSSG, uz redukciju velikog broja molekula H_2O_2 . GSSG se ponovo redukuje do GSH uz prisustvo NADPH koji je donor vodonika, a enzim GR katalizuje ovu reakciju. Aktivnost GPx je praćena posredno određivanjem potrošnje NADPH, odnosno oksidacije NADPH delovanjem GR na 340 nm. Aktivnost enzima izražavana je u jedinicama GPx aktivnosti po mg proteina (U/mg proteina).

U kvarcnu kivetu je redom dodavano 1,5 ml destilovane vode, 0,3 ml 1 mM GSH, 0,6 ml 0,2 mM NADPH, 0,1 ml 0,1 mM NaN_3 , 0,1 ml 1mM EDTA, 0,3 ml 0,5 M fosfatnog pufera pH 7,0, 0,2 ml uzorka, 0,1 ml 0,03 M t-butilhidroperoksida i 0,005 ml glutathion-reduktaze (105 IU/mg proteina). Nakon dodavanja GR reakcija je otpočinjala. Nakon blagog mućakanja, apsorbance je merena na 340 nm, pri temperaturi od 37°C, svakih 30 sec tokom 150 sec. Kao slepa proba korišćeni su rastvori bez dodatog uzorka (1,6 ml destilovane vode).

$$\text{GPx Aktivnost} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{bl}}) \cdot 3000}{6,22 \cdot V \cdot C_{\text{pr}}}$$

ΔA_{uz} - promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{bl} - promena apsorbance blanka u minuti, V - zapremina uzorka (ml), C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml), 6,22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

3.10.6. Određivanje aktivnosti glutathion reduktaze

Aktivnost ovog enzima određivana je metodom Glatzle i sar. (1974). Aktivnost GR je očitavana praćenjem brzine oksidacije NADPH, čiji je maksimum apsorbance na 340

nm. Aktivnost enzima izražavana je u jedinicama GR aktivnosti po mg proteina (U/mg proteina).

U kvarcnu kivetu je sipano: 0,6 ml fosfatnog pufera pH 7,4, 0,1 ml 2 mM GSSG, 0,1 ml 0,5 mM EDTA, 2 ml destilovane vode, 0,1 ml uzorka, i 0,1 ml 0,1 mM NADPH. Reakcija je počinjala kada je dodan NADPH. Za slepu probu su korišćeni isti rastvori, ali bez uzorka. Spektrofotometrijski je praćena apsorbance na talasnoj dužini od 340 nm prema slepoj probi, na temperaturi od 37°C, svakih 30 sec tokom 150 sec.

$$\text{GR Aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \cdot 3000}{6,22 \cdot V \cdot C_{pr}}$$

ΔA_{uz} - promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{bl} - promena apsorbance blanka u minuti, V - zapremina uzorka (ml), C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml), 6,22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

3.11. Određivanje koncentracije glutationa

3.11.1. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa

Koncentracija GSH određivana je u uzorcima jetre metodom Rahmana (2006). Uzorci su homogenizovani korišćenjem homogenizera (nem. Ultra-Turrax, T-25; Janke and Kunkel, Germany) u 0,1 M K_2H/KH_2PO_4 (KPE) pufer sa 5 mM EDTA pH 7,5. Precipitacija proteina iz homogenata jetre je sprovedena 10% salicilnom kiselinom i centrifugiranjem na 10000 x g 10 min / 4°C, nakon čega su supernatanti prebacivani u nove mikrotube.

Spektrofotometrijski GSH esej, prilagođen za mikrotitar čitač, podrazumeva oksidaciju GSH sa sulfhidrilnim reagensom 5,5'-ditio-bis 2-nitrobenzoičnom kiselinom (DTNB; Elamnov reagens), čiji produkti (TNB) se očitavaju na 412 nm. Brzina formiranja TNB je proporcionalna koncentraciji GSH u uzorku. Disulfidni proizvodi (GS-TNB) se redukuju enzimom GR uz prisustvo NADPH, reciklirajući GSH. Zato što GR redukuje formirani GSSG u 2GSH, količina izmerenog GSH predstavlja sumu redukovanog i oksidovanog GSH u uzorku (ukupni GSH).

Stopa promene apsorbance ($\Delta A_{412} \text{ nm/min}$) je proporcionalna ukupnoj koncentraciji GSH. Koncentracija nepoznatog uzorka je određivana izračunavanjem sa linearne standardne krive GSH.

3.11.2. Određivanje koncentracije oksidovanog glutationa

GSSG u uzorcima je meren odmah kako bi se izbegla oksidacija GSH u GSSG. Uzorci su tretirani sa 2-vinilpiridinom koji se kovalentno vezuje za GSH (ali ne i za GSSG). Višak 2-vinilpiridina je neutralisan s trietanolaminom. Ostatak procedure bio je identičan kao i za ukupni GSH.

Redukovani GSH je dobijen oduzimanjem GSSG od vrednosti ukupnog GSH. Vrednosti su izražavane u nM/mg proteina.

3.12. Određivanje koncentracije ukupnih tiolnih grupa

Koncentracija ukupnih SH grupa u krvnom serumu određivana je spektrofotometrijskom metodom (Ellman, 1959). Prilikom inkubacije SH grupa s Elmanovim reagensom, SH grupe reaguju i nastaje obojen kompleks. Merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 412 nm na spektrofotometru (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finland) meren je stepen obojenosti, a vrednosti koncentracije SH grupa dobijene su korišćenjem apsorpcionog koeficijenta za Elmanov reagens ($a = 14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Dobijeni rezultati su izražavani u nM/mg proteina.

3.13. Određivanje koncentracije reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline

Koncentracija reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (TBARS) određivana je u reakciji između MDA, proizvoda lipidne peroksidacije i tiobarbiturne kiseline (TBA), pri čemu je nastajao obojeni proizvod (Cynamon i sar., 1985).

Odmrznuto tkivo jetre je dodavano u Tris-EDTA pufer, pH 7,4, u odnosu 1:10. Homogenizovano je 3 x 30 sec korišćenjem homogenizera (nem. Ultra-Turrax, T-25; Janke and Kunkel, Germany). Nakon toga, homogenat je sonifikovan 3 x 5 sec ručnim sonifikatorom, na 30 KHz / sobna temperatura (Bandelin, Nemačka). U 700 μl sonifikata dodavano je 233 μl 40% trihloracetatne (sirćetne) kiseline, nakon čega je smeša snažno promućkana na vorteksu i centrifugirana na 10000 x g 10 min. 300 μl sonifikata je prebacivano u čiste mikrotube (rađeno u duplikatu), i u njih je dodavano 300 μl 0,6 % TBA (Sigma-Aldrich, Spain) uz mućkanje mikrotube. Uzorci su inkubirani 10 min na 100°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije, intenzitet boje nastalog proizvoda (roze do crveno) određivan je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na

535 nm. Koncentracija MDA izračunavana je na osnovu molarnog apsorpcionog koeficijenta bojenog proizvoda ($a = 1,56 \times 10^{-5} \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) i izražavana u nM/mg proteina.

3.14. Statistička analiza

Statistička analiza svih dobijenih rezultata je rađena primenom statističkog softvera GrpahPad Prism v6.01 (GraphPad Software, CA, USA). Pri statističkoj obradi prvo je ispitivana normalnost distribucije dobijenih rezultata unutar svake eksperimentalne grupe primenom Komogorov-Smirnov testa. Pošto je potvrđena normalna distribucija i homogenost varijanse Bartletovim (eng. *Bartlett*) testom u grupama starih pacova, korišćena je jednosmerna analiza varijanse (one-way ANOVA). Utvrđivanje značajnosti razlike između eksperimentalnih grupa poređenjem sa odgovarajućom kontrolnom grupom potvrđeno je Danetovim testom (eng. *Dunnett's post hoc* test). Statistička obrada rezultata MIKON i SIKON grupe životinja rađena je primenom Studentovog t-testa.

Efekat starenja na parametre tiroidne homeostaze utvrđen je poređenjem sa rezultatima dobijenim za MIKON. Potencijalni efekat rastvarača (suncokretovo ulje) je evaluiran u odnosu na SIKON, dok je efekat citrusnih flavanona za sve ispitivane parametre evaluiran u odnosu na KON.

Pokazano je da ne postoji razlika između strukturnih i funkcionalnih parametara štitaste žlezde fiziološki intaktne kontrolne grupe starih pacova (SIKON) i kontrolne grupe tretirane suncokretovim uljem (KON), tako da je svako poređenje grupa tretiranih NAR ili HES odnosi na KON životinje.

Statistički značajnom smatrana je razlika sa sledećim nivoima značajnosti: * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$. Rezultati su predstavljani kao aritmetička srednja vrednost grupe \pm SD.

4. REZULTATI

4.1. Telesna masa, apsolutna i relativna masa organa

Telesna masa, apsolutna i relativna masa organa pacova iz svih eksperimentalnih grupa prikazana je u Tabeli 4.1.

U odnosu na MIKON pacove, kod pacova SIKON grupe primetan je fiziološki prirast telesne mase koji prati povećanje apsolutne mase svih ispitivanih organa (Tabela 4.1). Telesna masa je povećana 66% ($p < 0,0001$), dok su apsolutna masa štitaste žlezde, jetre i retroperitonealnog belog masnog tkiva povećane za 46% ($p < 0,0001$), 19% ($p < 0,05$) i 76% ($p < 0,0001$). Poređenjem relativnih masa organa ne uočava se razlika između vrednosti dobijenih za ove dve starosne grupe životinja.

Između SIKON i KON nije bilo statistički značajnih razlika u telesnoj masi, apsolutnoj i relativnoj masi organa. Tretmani citrusnim flavanonima nisu izmenili telesnu masu, kao ni apsolutnu i relativnu masu organa u poređenju sa vrednostima KON grupe.

Tabela 4.1 Telesna masa, apsolutna i relativna masa štitaste žlezde, jetre i retroperitonealnog belog masnog tkiva mladih i starih mužjaka pacova. Fiziološki intaktna kontrolna grupa mladih (MIKON) i starih (SIKON) pacova, kontrolna grupa starih pacova tretiranih suncokretovim uljem (KON) i grupe starih pacova tretiranih naringeninom (NAR) ili hesperetinom (HES).

Grupe	Telesna masa		Apsolutna masa		Relativna masa		Apsolutna masa		Relativna masa		Apsolutna masa		Relativna masa	
	pre početka eksperimenta (g)	na kraju eksperimenta (g)	lobusa štitaste žlezde (g)	štitaste žlezde (g)	lobusa štitaste žlezde (g/t.m.)	štitaste žlezde (g/t.m.)	lobusa štitaste žlezde (g)	štitaste žlezde (g)	lobusa štitaste žlezde (g/t.m.)	štitaste žlezde (g/t.m.)	lobusa štitaste žlezde (g)	štitaste žlezde (g)	lobusa štitaste žlezde (g/t.m.)	štitaste žlezde (g/t.m.)
MIKON	463 ± 40	470 ± 39	11,3 ± 1,3	2,2 ± 0,2	14,2 ± 1,2	3,2 ± 0,2	9,8 ± 2,2	2,3 ± 0,4						
SIKON	770 ± 44****	697 ± 45****	20,2 ± 3,1****	2,6 ± 0,6	20,8 ± 1,6*	2,9 ± 0,2	17,2 ± 1,1*	2,6 ± 0,3						
KON	680 ± 44	633 ± 42	16,2 ± 1,7	2,2 ± 0,4	17,3 ± 1,9	2,8 ± 0,1	15,2 ± 2,2	2,4 ± 0,3						
NAR	691 ± 25	645 ± 44	18,2 ± 2,6	2,4 ± 0,2	17,8 ± 1,9	2,7 ± 0,3	15,4 ± 2,1	2,3 ± 0,2						
HES	745 ± 93	686 ± 79	20,8 ± 1,7	2,7 ± 0,1	19,3 ± 2,0	2,8 ± 0,3	15,5 ± 4,6	2,4 ± 0,6						

RpBMT – retroperitonealno belo masno tkivo. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD; n=6. * p < 0,05 i **** p < 0,0001

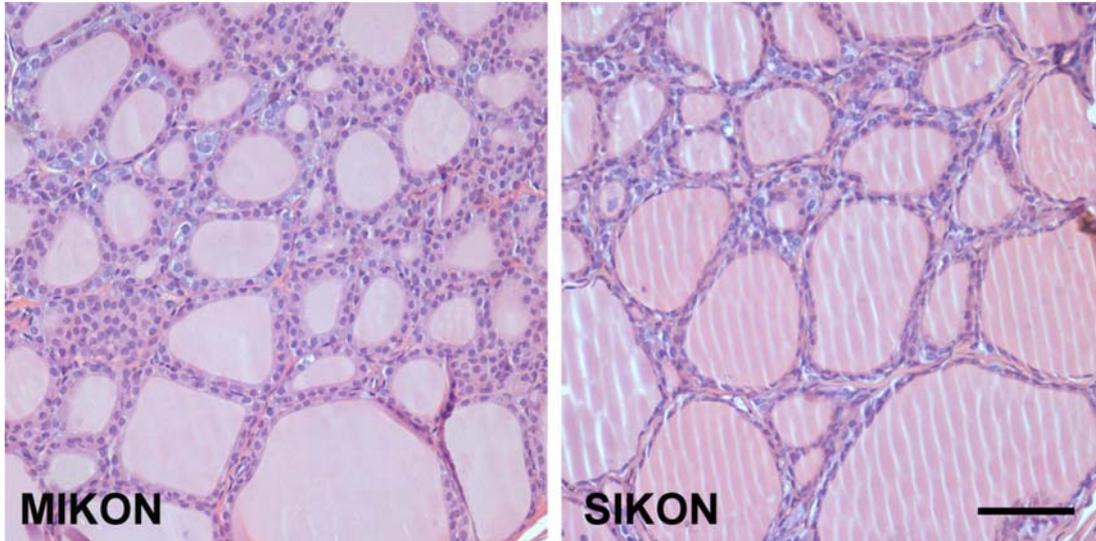
4.2. Strukturna i funkcionalna karakterizacija štitaste žlezde starih mužjaka pacova

4.2.1. Kvalitativno-histološke karakteristike štitaste žlezde starih mužjaka pacova

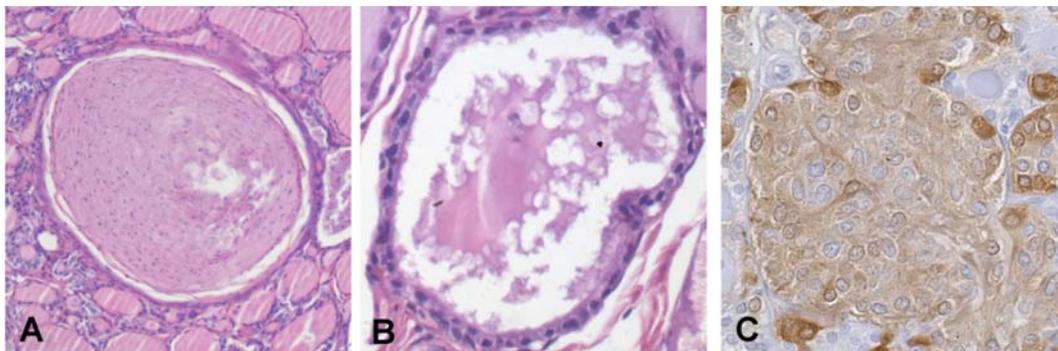
Štitasta žlezda MIKON grupe pacova sastoji se iz dva lobusa koji su povezani istmusom. Žlezda je obavijena tankom, fibroznom kapsulom, od koje polaze septe ka unutrašnjosti. Parenhim žlezde čine hormon-produkujuće ćelije folikulskog epitela i parafolikulske C ćelije koje sintetišu i sekretuju TH i kalcitonin. Folikul se sastoji iz jednoslojnog epitela koji okružuje koloid. C ćelije nikada nisu u direktnom kontaktu sa lumenom koloida. Štitasta žlezda je bogata mrežom krvnih sudova koji okružuju folikule, formirajući angiofolikulske jedinice. Intersticijum žlezde čine komponente vezivnog tkiva, fibrozna i kolagena vlakna, krvni sudovi, limfni sudovi i nervi.

Parenhim štitaste žlezde pacova MIKON grupe čine folikuli različitih dimenzija. Periferno su raspoređeni makrofolikuli ispunjeni velikom količinom koloida i niskoprizmatičnim epitelom (Slika 4.1). Centralno lokalizovani folikuli manjih dimenzija sadrže manju količinu koloida, a oivičeni su kuboidalnim folikulskim epitelom (Slika 4.1).

Folikulska struktura žlezde kod starih adultnih životinja je očuvana. Ipak, za razliku od MIKON pacova, u centralnom delu žlezde u najvećoj meri su zastupljeni folikuli većih dimenzija, proširenog lumena, oivičeni tankim, jednoslojnim epitelom (Slika 4.1). Osim velikih, u parenhimu SIKON životinja prisutan je i izvestan broj folikula manjih dimenzija. Tkivo štitaste žlezde životinja ove grupe karakterišu benigne promene: fokalna hiperpazija C ćelija (Slika 4.2), kao i često prisustvo cisti, folikulskih i ultimobranhijalnih (Slika 4.2), a moguća je hiperplazija folikulskog epitela.



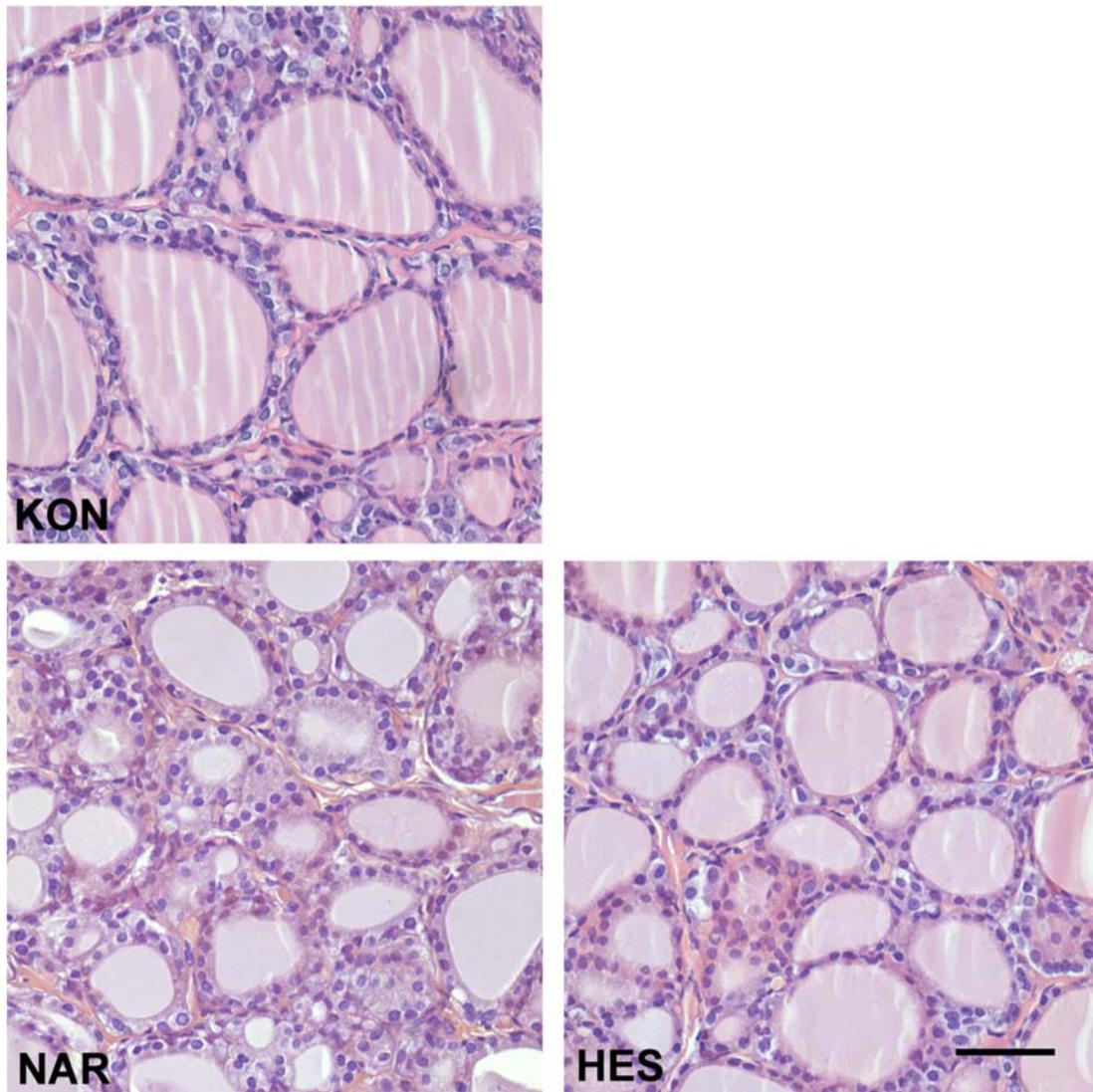
Slika 4.1 Poprečni presek štitaste žlezde (Hematoksilin eozin bojenje). MIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa mladih mužjaka pacova; SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa starih mužjaka pacova. Bar - 50 μ m.



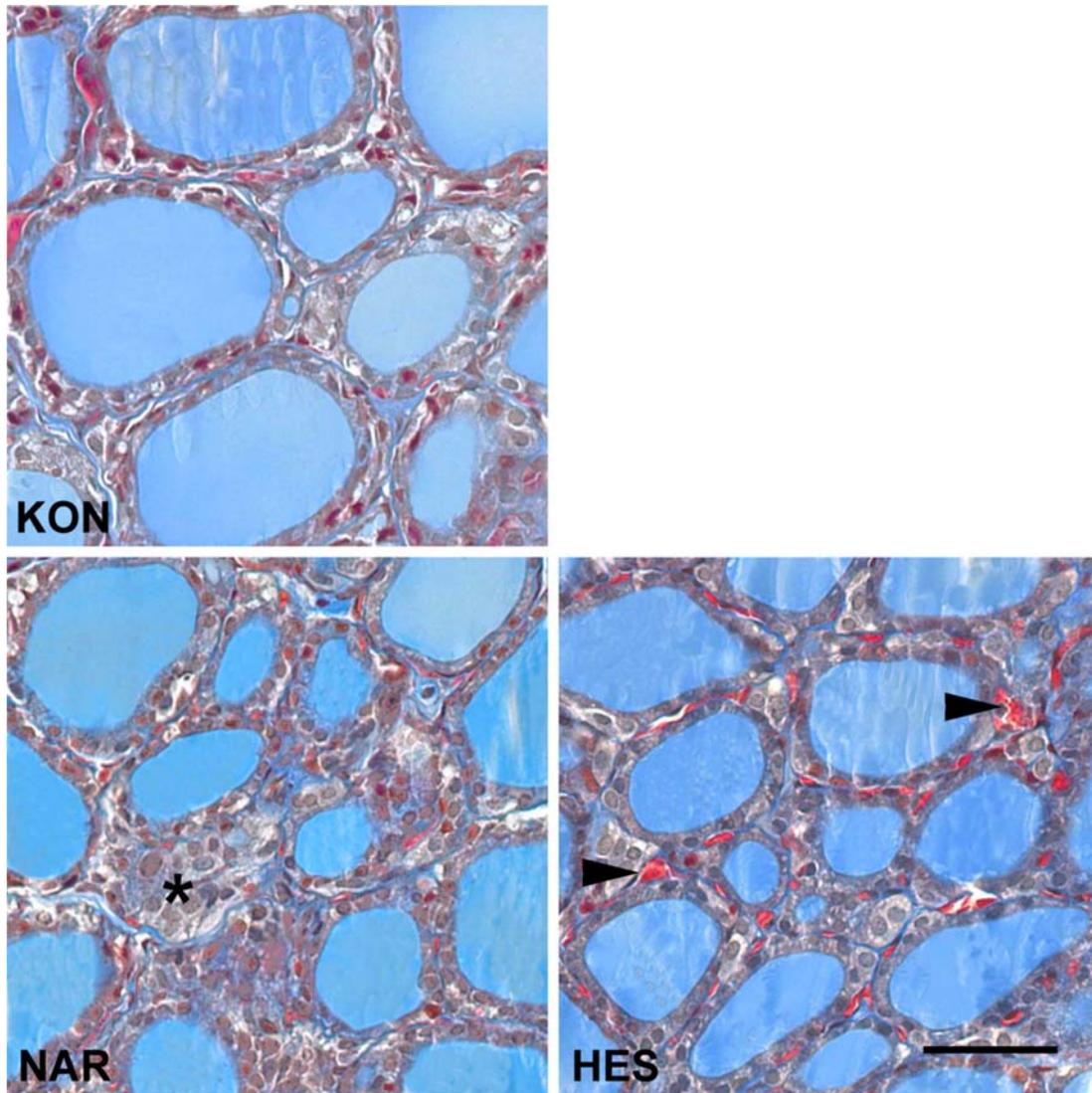
Slika 4.2 Ultimobranhijalna cista (A), folikulska cista (B) i hiperplazija C ćelija (C) u štitastoj žlezdi fiziološki intaktne kontrolne grupe starih mužjaka pacova (SIKON). Ciste, hematoksilin eozin bojenje; C ćelije, kalcitonin imunohistohemijsko bojenje. Bar - 100 μ m.

4.2.2. Kvalitativno-histološke karakteristike štitaste žlezde starih mužjaka pacova nakon tretmana citrusnim flavanonima

Nakon tretmana citrusnim flavanonima, centralni folikuli se karakterišu smanjenom količinom luminalnog koloida u poređenju sa KON pacovima, što je izrazitije nakon tretmana NAR (Slika 4.3). Na presecima štitaste žlezde nakon Masson trihromatskog bojenja uočava se izvesno povećanje intersticijuma, koje se ogleda u dilatiranoj mikrovaskularnoj mreži i povećanoj zastupljenosti C ćelija (Slika 4.4).



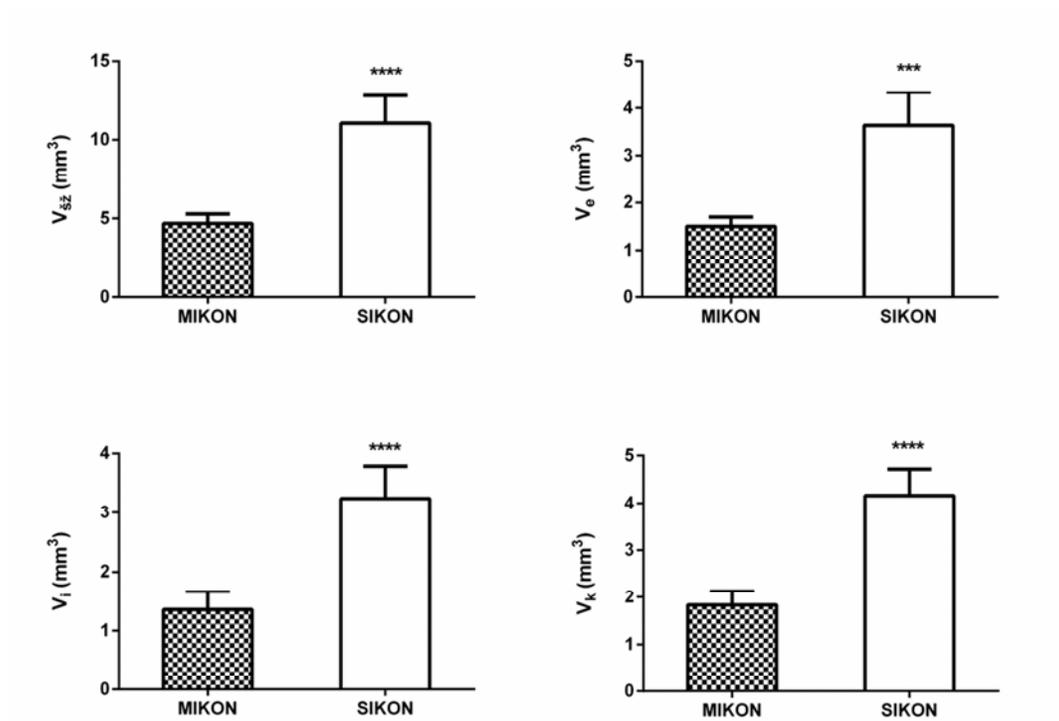
Slika 4.3 Poprečni presek štitaste žlezde starih mužjaka pacova (Hematoksilin eozin bojenje). KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Bar – 50 μ m.



Slika 4.4 Poprečni presek štitaste žlezde starih mužjaka pacova (Masson trihromatsko bojenje). KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Zvezdica, interfolikulske C ćelije; vrhovi strelica, mikrocirkulacija oko parenhimskog tkiva. Bar – 50 μ m.

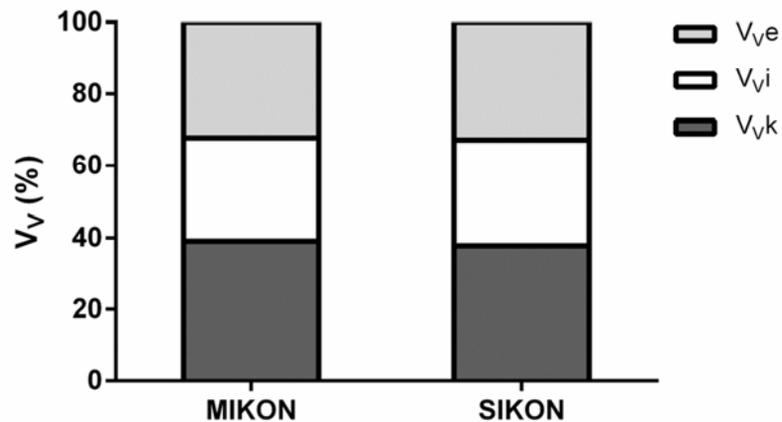
4.2.3. Stereološke karakteristike štitaste žlezde starih mužjaka pacova

Apsolutni volumen štitaste žlezde ($V_{\text{šz}}$) MIKON grupe iznosio je $4,69 \pm 0,6 \text{ mm}^3$. Apsolutni volumeni epitela (V_e), intersticijuma (V_i) i koloida (V_k) iznose $1,5 \pm 0,19$, $1,36 \pm 0,31$ i $1,84 \pm 0,3 \text{ mm}^3$. Kod starih pacova došlo je do povećanja svih ispitivanih parametara u poređenju s MIKON pacovima: $V_{\text{šz}}$ je povećan za 135% ($p < 0,0001$), V_e za 142% ($p < 0,001$), dok su V_i i V_k povećani za 140%, odnosno za 135%, ($p < 0,0001$), respektivno (Slika 4.5).



Slika 4.5 Apsolutni volumen štitaste žlezde ($V_{\text{šz}}$), epitela (V_e), intersticijuma (V_i) i koloida (V_k) fiziološki intaktne kontrolne grupe mladih (MIKON) i fiziološki intaktne kontrolne grupe starih mužjaka pacova (SIKON). Rezultati predstavljaju aritmetičku srednju vrednost grupe \pm SD; $n=5$. *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$.

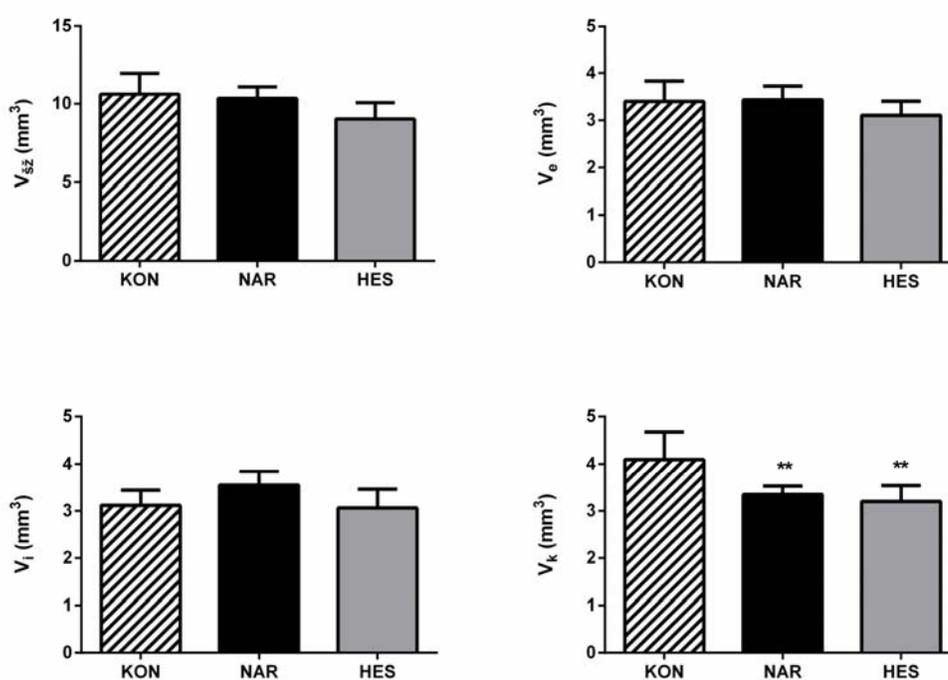
Procentualna zastupljenost apsolutnih volumenskih gustina folikulskog epitela (V_{ve}), intersticijuma (V_{vi}) i koloida (V_{vk}) u štitastoj žlezdi MIKON i SIKON pacova predstavljena je na Slici 4.6. Procentualna zastupljenost faza nije izmenjena sa starenjem (Slika 4.6), iako su vrednosti njihovih apsolutnih volumena povećane (Slika 4.5), što je u skladu sa očuvanom strukturom žlezde tokom starenja.



Slika 4.6 Procentualna zastupljenost volumenskih gustina folikulskog epitela (V_{ve}), intersticijuma (V_{vi}) i koloida (V_{vk}) u štitastoj žlezdi fiziološki intaktne kontrolne grupe mladih (MIKON) i fiziološki intaktne kontrolne grupe starih (SIKON) mužjaka pacova. Rezultati predstavljaju aritmetičku srednju vrednost grupe. $n=5$.

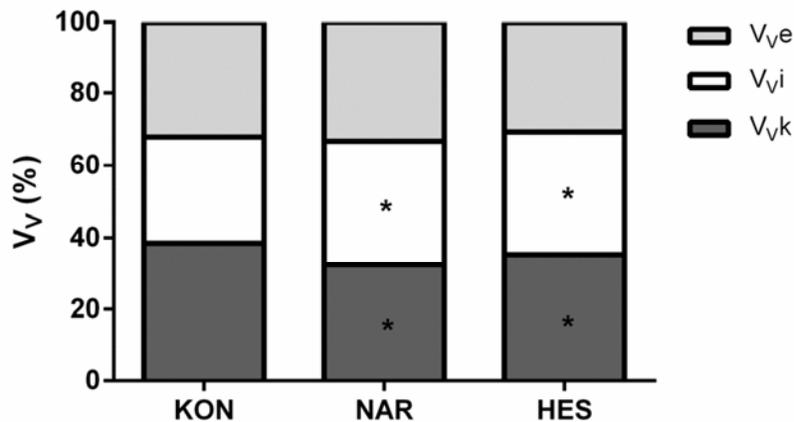
4.2.4. Stereološke karakteristike štitaste žlezde nakon tretmana citrusnim flavanonima

Tretmani citrusnim flavanonima nisu izmjenili apsolutni volumen štitaste žlezde. Od svih ispitivanih parametara, jedino je V_k smanjen za 18% ($p < 0,01$) nakon tretmana NAR i 22% ($p < 0,01$) nakon tretmana HES u poređenju s KON vrednostima (Slika 4.7).



Slika 4.7 Apsolutni volumen štitaste žlezde (V_{sz}), epitela (V_e), intersticijuma (V_i) i koloida (V_k) starih mužjaka pacova. KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Rezultati predstavljaju aritmetičku srednju vrednost grupe \pm SD; $n=5$. ** $p < 0,01$.

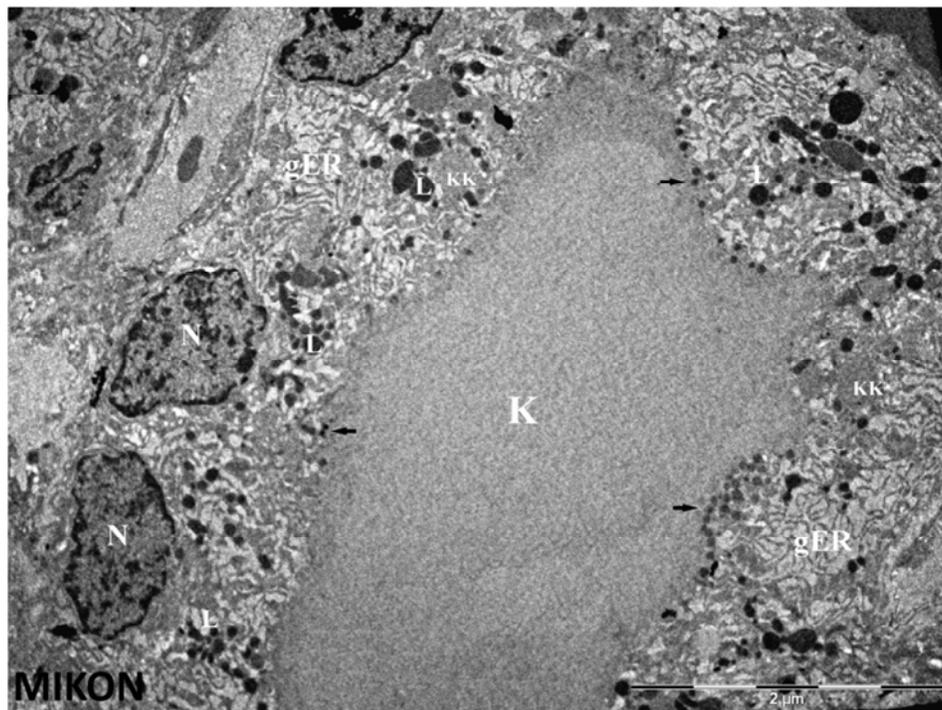
Procentualna zastupljenost volumenske gustine epitela (V_{ve}), intersticijuma (V_{vi}) i koloida (V_{vc}) štitaste žlezde kontrolnih i životinja tretiranih citrusnim flavanonima predstavljani su na Slici 4.7. Nakon tretmana NAR i HES, V_{vc} se smanjila za 16% ($p < 0,05$) i 9% ($p < 0,05$; Slika 4.8), dok se V_{vi} povećala za 16% ($p < 0,05$) i 14% ($p < 0,05$, Slika 4.8), u poređenju sa vrednostima dobijenim za KON životinje. V_{ve} nije bila značajno izmenjena nakon tretmana NAR i HES (Slika 4.8).



Slika 4.8 Procentualna zastupljenost volumenskih gustina folikuluskog epitela (V_{ve}), intersticijuma (V_{vi}) i koloida (V_{vk}) u štitastoj žlezdi starih mužjaka pacova. KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Rezultati predstavljaju aritmetičku srednju vrednost grupe; $n=5$. * $p < 0,05$.

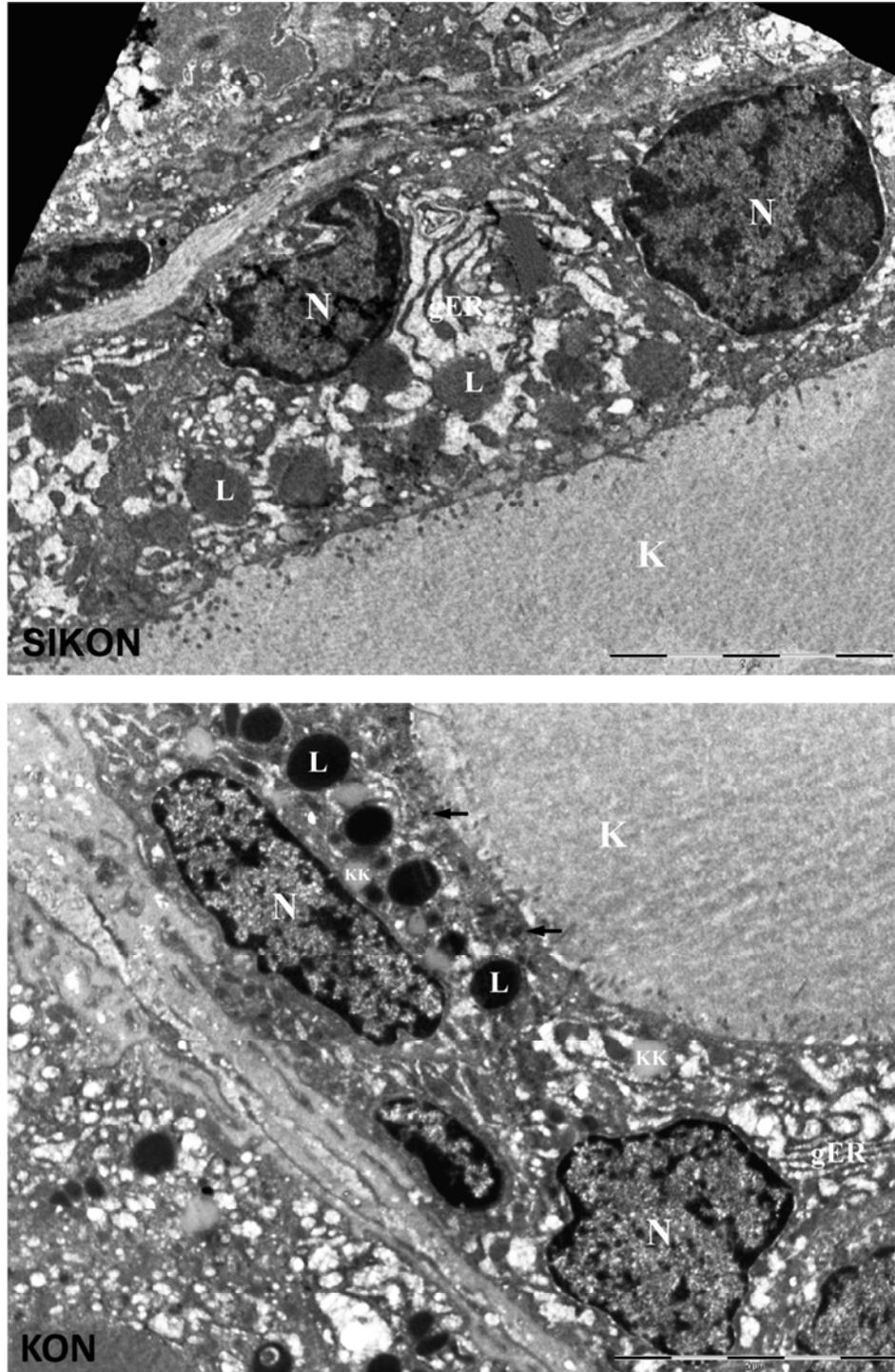
4.3. Ultrastrukturna analiza štitaste žlezde

Tirociti štitaste žlezde MIKON pacova pokazuju regularnu strukturu sa bazalno-apikalnom orijentacijom. Euhromatinsko jedro (N) pozicionirano bazalno, okruženo je razvijenom, dilatiranom mrežom gER (Slika 4.9). U citoplazmi se nalazi veliki broj polimorfnih lizozoma (L), uz koloidne kapi (kk) različitog dijametra (Slika 4.9). Kuboidalni epitel ukazuje na veoma dinamičnu i aktivnu žlezdu kako u pogledu sinteze tirogloblina (strelice; Slika 4.9), tako i u procesu njegove razgradnje (koloidne kapi okružene lizozomima; Slika 4.9).



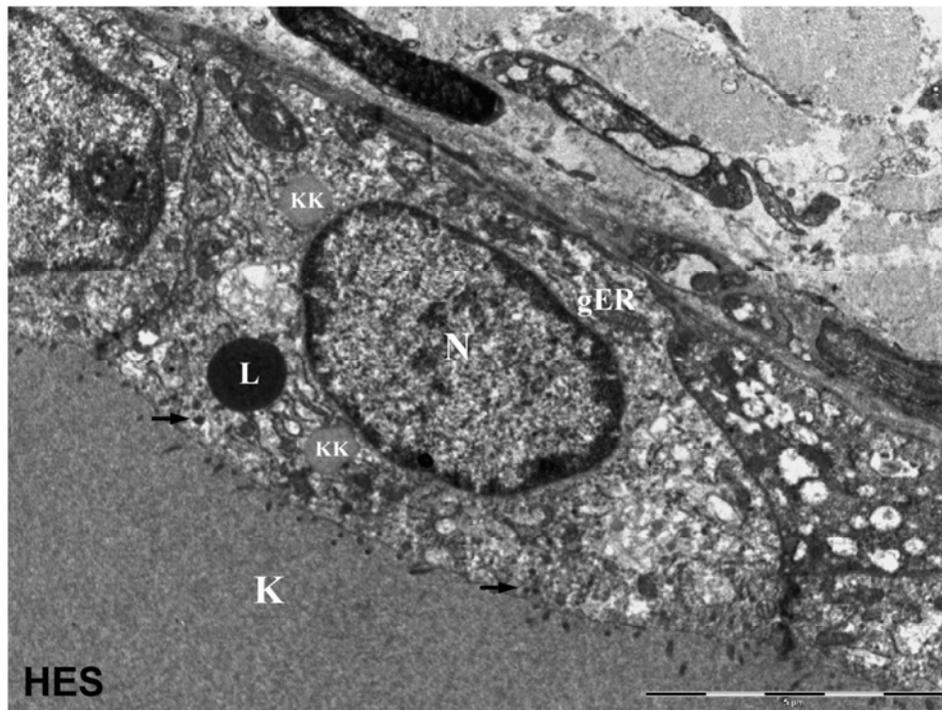
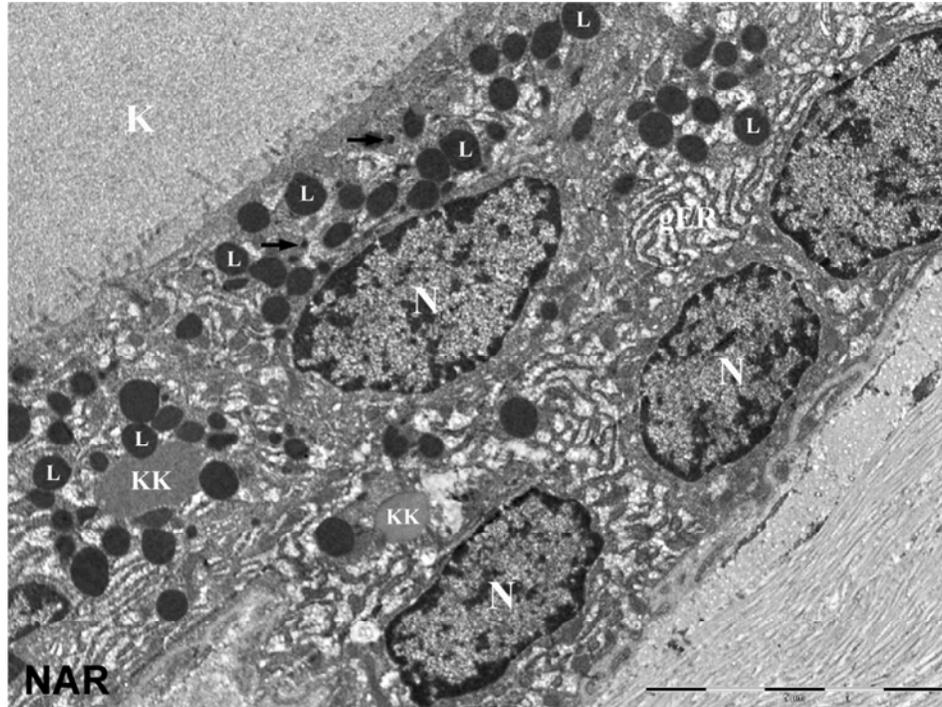
Slika 4.9 Ultratanki presek štitaste žlezde fiziološki intaktne kontrolne grupe mladih pacova (MIKON). K, koloid; N, jedro; gER, granulirani endoplazmatični retikulum; L, lizozom; kk, koloidna kap; strelica, tiroglobulin. Bar – 2 μ m.

U tirocitima štitaste žlezde SIKON pacova očuvana je polarizacija ćelije od bazalnog ka apikalnom polu. Jedro (N) je lokalizovano bazalno i oko njega se uočavaju dilatirane cisterne gER (SIKON; Slika 4.10). Folikulski epitel je niskoprizmatičan. Na apikalnoj membrani su mikrovili uronjeni u lumen koloida (K; SIKON i KON; Slika 4.10). U citoplazmi se uočavaju koloidne kapi (kk) različitih dimenzija. Uz kapi koloida prisutni su lizozomi (L) različite veličine (eng. *dense bodies*), kao i male, tamne vezikule u blizini apikalnog pola koje sadrže novosintetisani tirogloubulin (strelica; Slika 4.10) i koji su manje brojni u odnosu na tirocite iz MIKON grupe.



Slika 4.10 Ultratanki preseki štitaste žlezde starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa starih pacova; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem. K, koloid; N, jedro; gER, granulirani endoplazmatični retikulum; L, lizozom; kk, koloidna kap; strelica, tiroglobulin. Bar - 5µm.

Nakon tretmana NAR folikularni epitel je visokoprizmatičan, sa izraženo aktivnim ćelijama (Slika 4.11). U bazalnom delu tirocita je pozicionirano veliko, okruglo jedro (N) oko kojeg se nalaze cisterne gER, manje dilatirane u odnosu na KON (Slika 4.11). U citoplazmi se uočava razvijen Goldžijev aparat. Na apikalnom polu ćelije primećuju se brojni mikrovili. Polimorfni lizozomi (L) su u većem broju zastupljeni u citoplazmi u odnosu na KON, kao i koloidne kapi (kk) različitog dijametra (Slika 4.11). Nekoliko lizozoma različite veličine okružuju koloidnu kap i pripremaju se za fuziju s' njom što ukazuje na aktivnu sekretornu funkciju ćelije. U citoplazmi, bliže apikalnom polu prisutne su granule Tg, zastupljene u istoj meri kao i kod KON (strelice; Slika 4.11). Ultrastrukturno, štitasta žlezda HES grupe karakteriše se manje aktivnom žlezdom u odnosu na NAR grupu. Folikularni epitel je kuboidalni, viši u poređenju sa KON a niži u odnosu na NAR (Slika 4.10 i 4.11). Centralno postavljeno jedro (N) ispunjava 1/3 ćelije i okruženo je gER, bez vidljivog Goldžijevog aparata (Slika 4.11). Uočava se znatno manji broj lizozoma (L) i mestimično pokoja koloidna kap (kk) većeg dijametra (Slika 4.11).

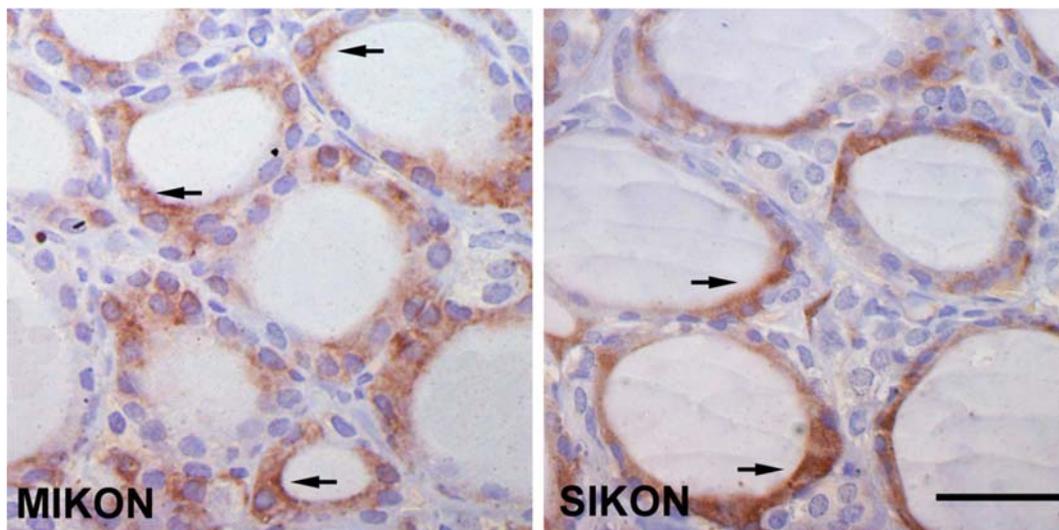


Slika 4.11 Ultratanki preseci štitaste žlezde starih mužjaka pacova. NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. K, koloid; N, jedro; gER, granulirani endoplazmatični retikulum; L, lizozom; kk, koloidna kap; strelica, tiroglobulin. Bar - 5 μ m.

4.4. Funkcionalno-morfološka karakterizacija štitaste žlezde starih mužjaka pacova

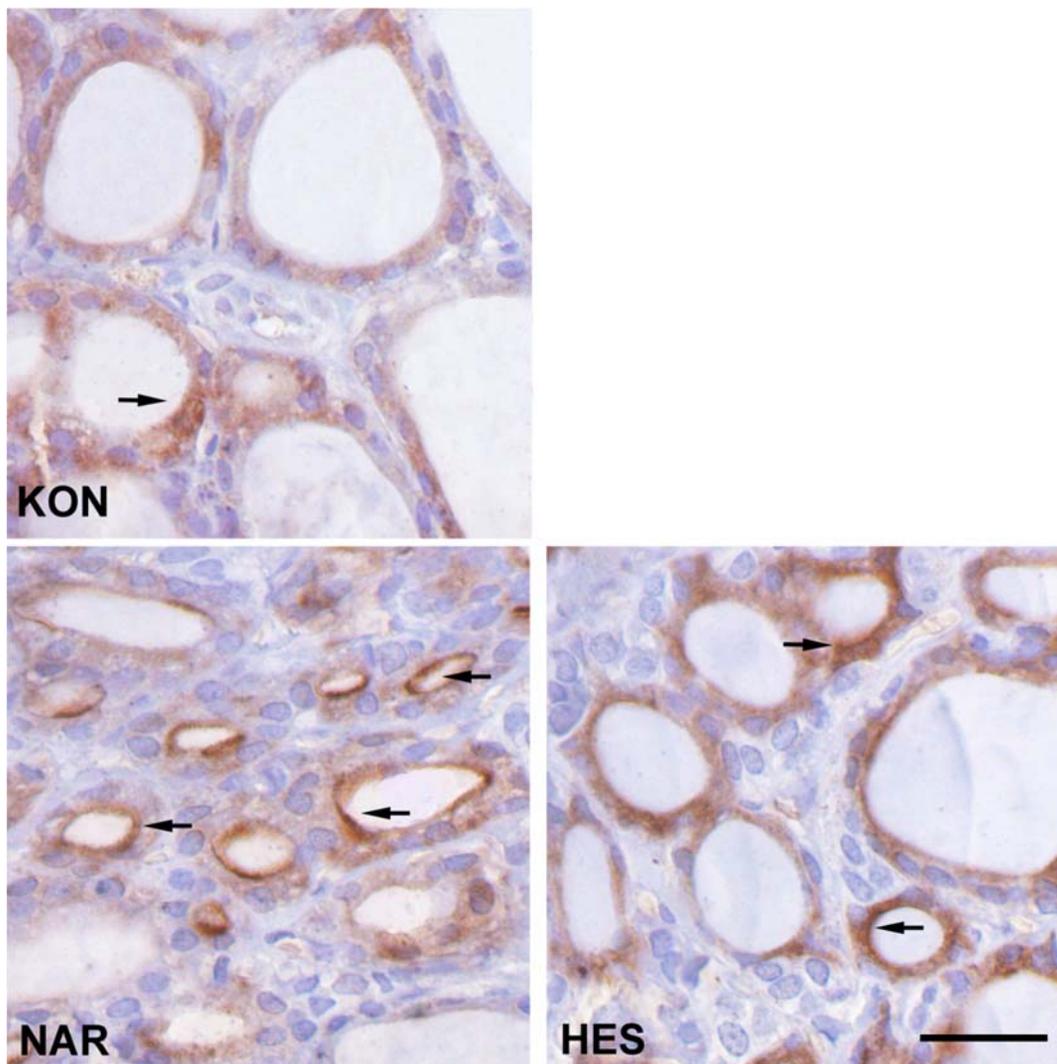
Nakon osnovne kvalitativne i kvantitativne histološke analize, primenom IHH i IF metode sprovedena je analiza specifičnih proteina štitaste žlezde: tiroidne peroksidaze (TPO), tiroglobulina (Tg) i tiroksina vezanog za Tg (T_4 -Tg), koji predstavljaju specifične markere funkcije štitaste žlezde, zatim natrijum-jodidnog kotransportera (NIS), aktivnog transportera joda iz cirkulacije u tirocite. Takođe, ispitivan je i vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) kao marker angiogeneze.

U štitastoj žlezdi MIKON, SIKON i KON pacova ne uočava se razlika u ekspresiji TPO (Slika 4.12 i 4.13). Granularna TPO imunopozitivnost je isključivo karakteristika ćelija folikuluskog epitela. Heterogenost ekspresije ovog proteina prisutna je između folikula, ali i unutar jednog folikula, tako da neki tirociti ekspimiraju snažnu imunoreaktivnost, dok su drugi imunonegativni (Slika 4.12). Lokalizacija je apikalna i citoplazmatska, a pojedini tirociti imaju izrazitu apikalnu lokalizaciju (strelica; Slika 4.12)



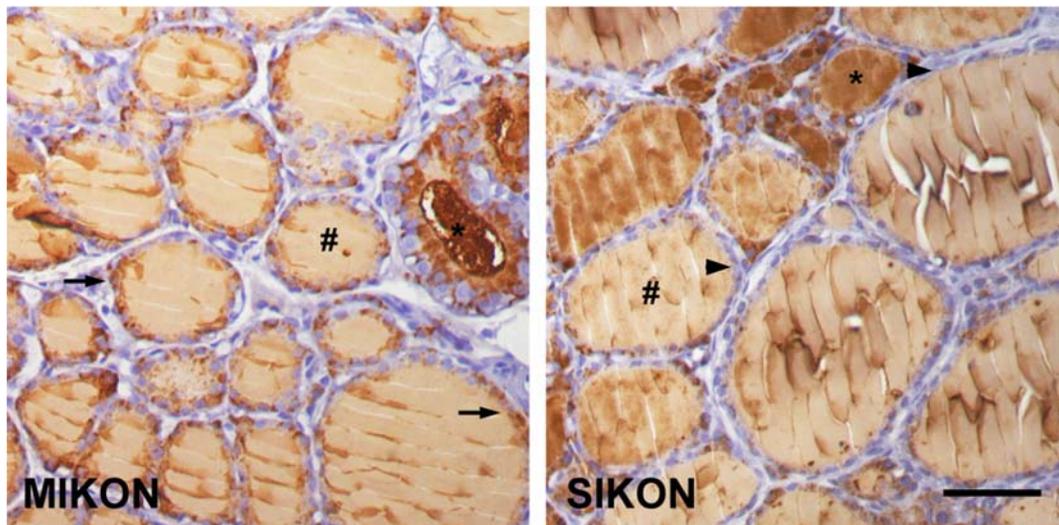
Slika 4.12 Imunohistohemijska ekspresija tiroidne peroksidaze (TPO) u štitastoj žlezdi fiziološki intaktne kontrolne grupe mladih (MIKON) i fiziološki intaktne kontrolne grupe starih mužjaka pacova (SIKON). Strelica, apikalna lokalizacija TPO. Bar – 25 μ m.

U odnosu na KON, u malim folikulima štitaste žlezde NAR grupu pacova, TPO imunopozitivnost je intenzivnija i koncentrisana u regionu apikalne membrane tirocita (strelica; Slika 4.13). Nakon tretmana HES, intenzitet imunohistohemijske ekspresije TPO je pojačan a lokalizacija apikalna i citoplazmatska (Slika 4.13). Ne uočava se razlika u intenzitetu ekspresije TPO između NAR i HES.



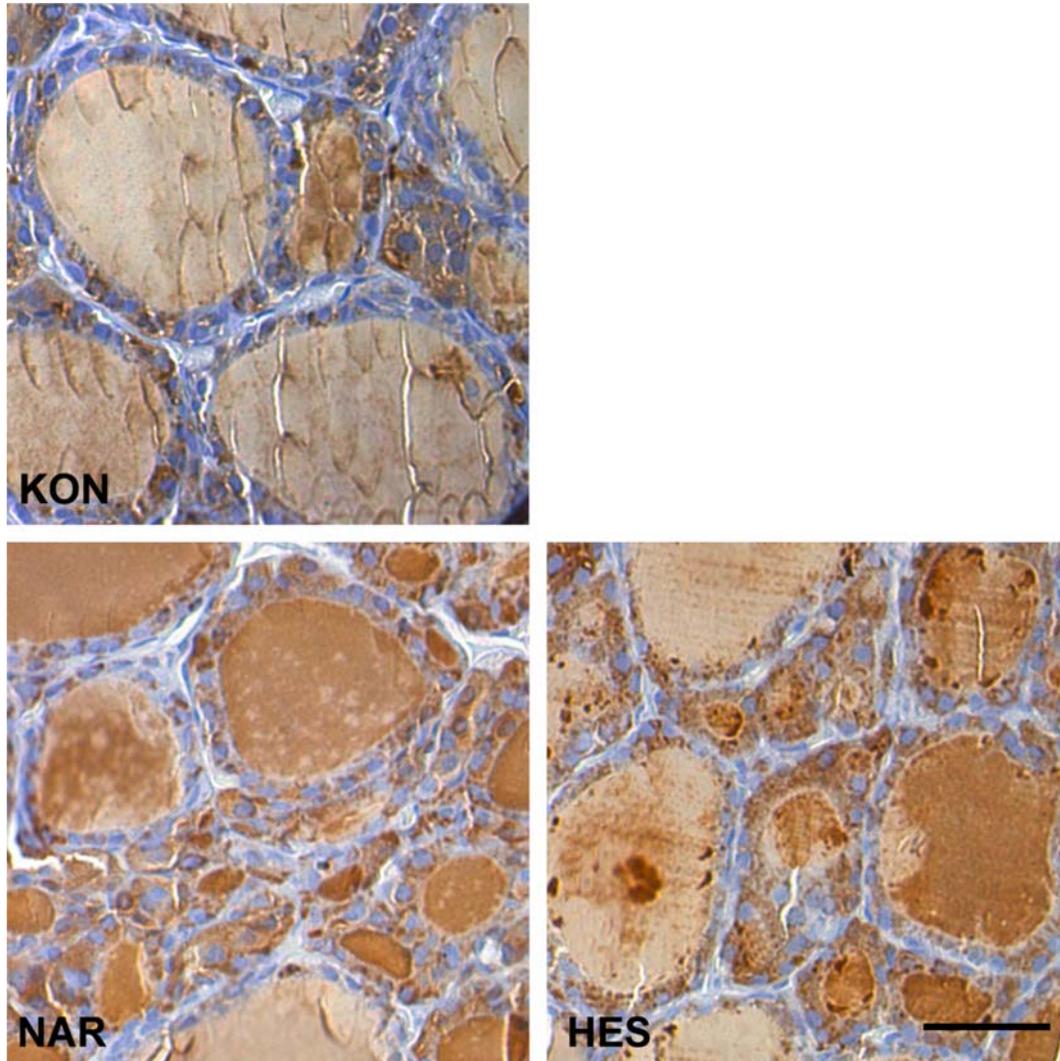
Slika 4.13 Imunohistohemijska ekspresija tiroidne peroksidaze (TPO) u štitastoj žlezdi starih mužjaka pacova. KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Strelica, apikalna lokalizacija TPO. Bar – 25 μ m.

Analiza imunohistohemijske ekspresije Tg pokazala je intenzivnu granuliranu imunopozitivnost u citoplazmi folikuskog epitela i slabiju imunopozitivnost koloida većine folikula. Mestimično se uočavaju mali folikuli koje karakteriše intenzivna Tg-imunopozitivnost samog koloida. Između folikula MIKON i SIKON grupe se ne uočava razlika u lokalizaciji i intenzitetu Tg-imunopozitivnosti epitela. Međutim, brojniji su tamniji, intenzivnije obojeni mali folikuli u parenhimu SIKON pacova, iako je kod MIKON grupe prisutna jača granulirana citoplazmatska imunopozitivnost (Slika 4.14).



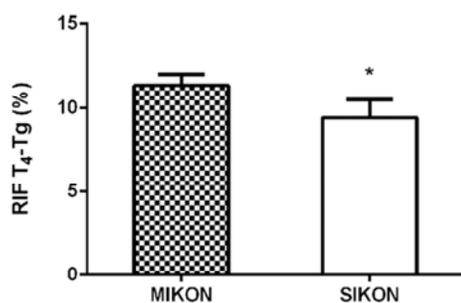
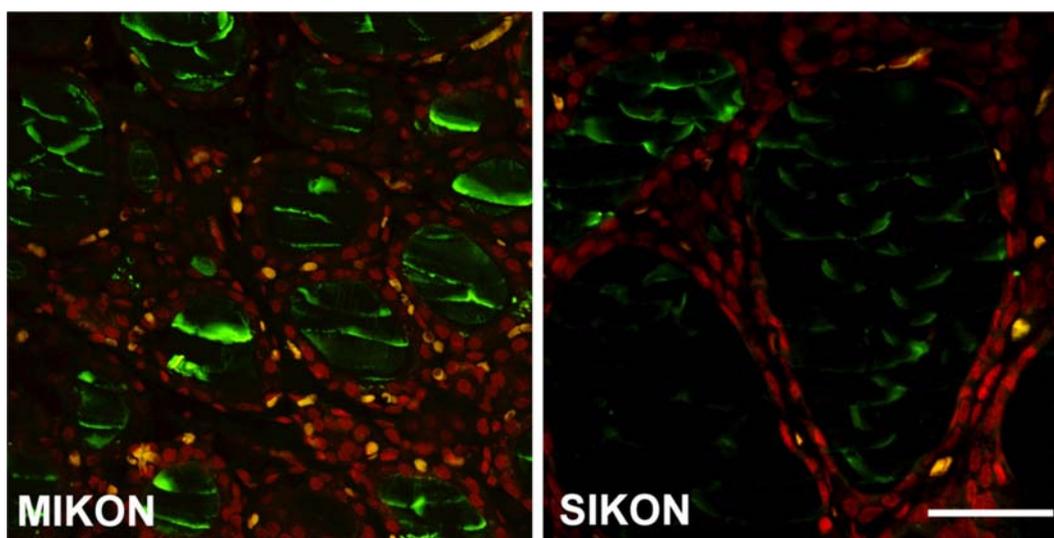
Slika 4.14 Imunohistohemijska ekspresija tiroglobulina (Tg) u štitastoj žlezdi fiziološki intaktne kontrole grupe mladih (MIKON) i fiziološki intaktne kontrolne grupe starih mužjaka pacova (SIKON). Zvezdica, jaka imunoobojenost; #, slaba imunoobojenost; strelica, granulirana citoplazma; vrh strelice, negranulisana citoplazma. Bar – 50 m.

Nakon tretmana citrusnim flavanonima ekspresija Tg je mnogo intenzivnija u luminalnom koloidu velikih i malih folikula u poređenju sa KON grupom (slika 4.15). Tg- imunopozitivnost epitela nije promenjena u odnosu na KON (Slika 4.15). S' druge strane, neki od velikih folikula pokazuju snažnu imunopozitivnost u koloidu, koja se uočava i kod malih folikula. Kod oba tipa folikula, ekspresija Tg je prisutna i u folikulskom epitelu. Pojedinačni tirociti su uglavnom svi imunopozitivni.



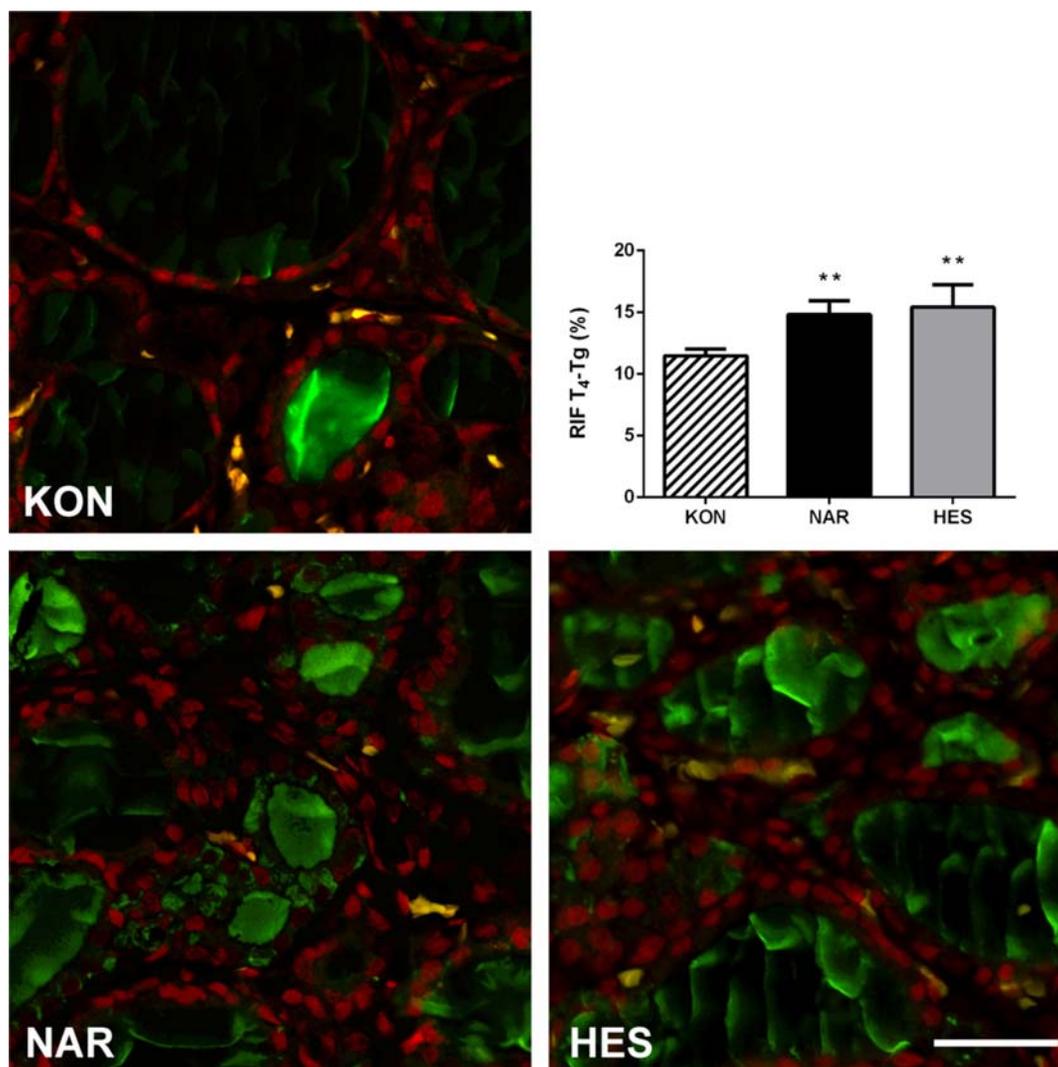
Slika 4.15 Imunohistohemijska ekspresija tiroglobulina (Tg) u štitastoj žlezdi starih mužjaka pacova. KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Zvezdica, jaka imunoobojenost; #, slaba imunoobojenost; strelica, granulirana citoplazma; vrh strelice, negranulisana citoplazma. Bar – 25 μ m.

Imunofluorescentna analiza IF ekspresije T_4 vezanog za Tg je merilo prisutnosti tiroksina u žlezdi. Folikule centralnog dela štitaste žlezde MIKON pacova karakteriše prisustvo jakog IF signala u delu koloida uz apikalnu membranu tirocita (Slika 4.16). Kod SIKON i KON pacova folikule centralnog regiona većih dimenzija odlikuje nedostatak ili slab IF signal u luminalnom koloidu (Slika 4.16 i 4.17). Mestimično su prisutni folikuli malih dimenzija sa intenzivnijom obojenošću (Slika 4.16). Relativni intenzitet fluorescence (RIF) SIKON grupe niži je za 17% ($p < 0,05$) u odnosu na vrednosti MIKON grupe životinja (Slika 4.16).



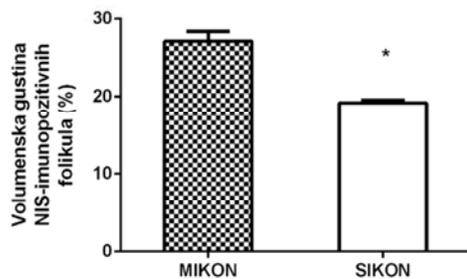
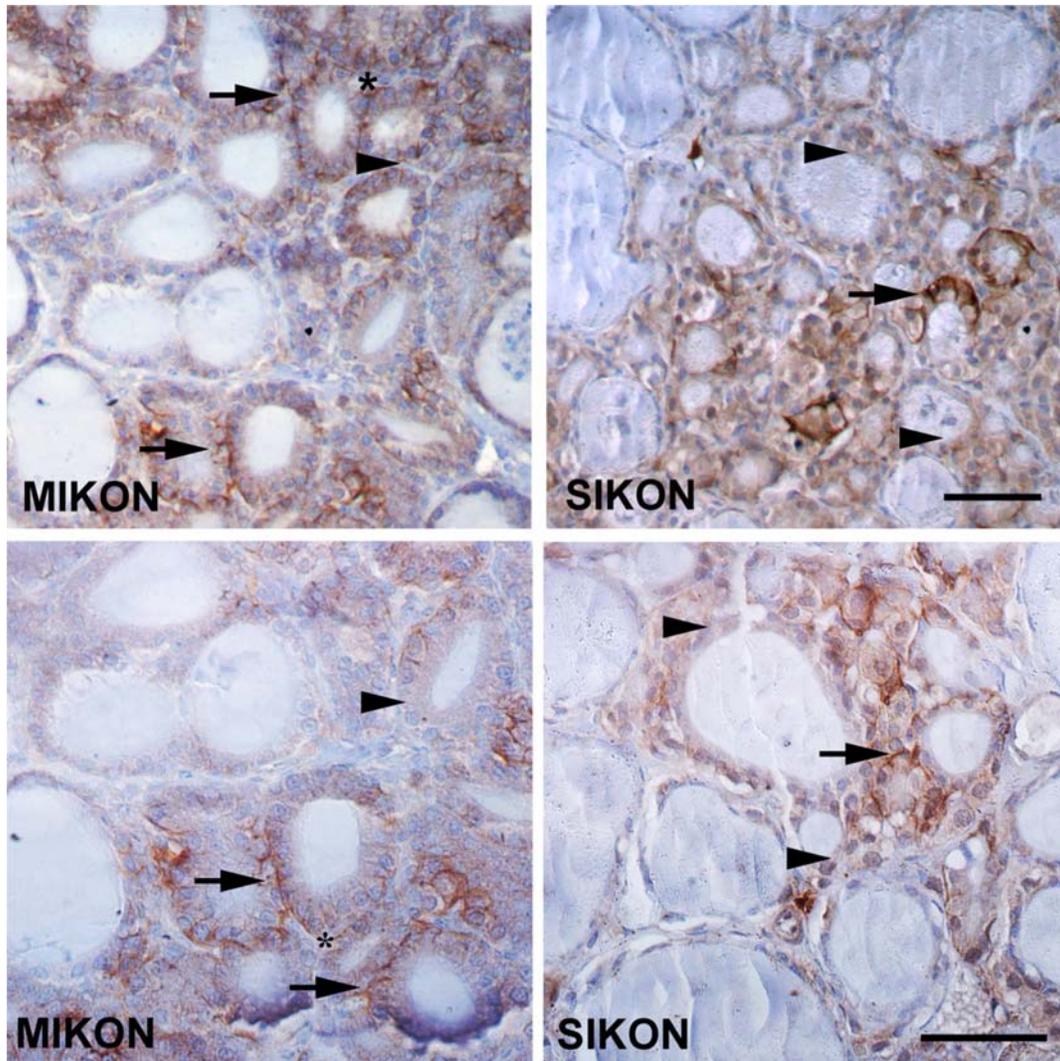
Slika 4.16 Imunofluorescentna ekspresija tiroksina vezanog za tiroglobulin (T_4 -Tg) u štitastoj žlezdi fiziološki intaktne kontrolne grupe mladih (MIKON) i fiziološki intaktne kontrolne grupe starih mužjaka pacova (SIKON). Zeleni signal, T_4 -Tg; crveni signal, jedra kontrastirana propidijum jodidom. Bar – 25 μ m. Rezultat predstavlja aritmetičku srednju vrednost grupe \pm SD, n=6. * $p < 0,05$.

Kvantitativna IF analiza je pokazala povećan RIF u grupi tretiranoj NAR i to za 29% ($p < 0.05$; Slika 4.17) u poređenju s KON grupom životinja (Slika 4.17). Nakon tretmana HES, RIF je povećan 34% ($p < 0.05$; Slika 4.17) u poređenju s vrednošću dobijenom za KON.



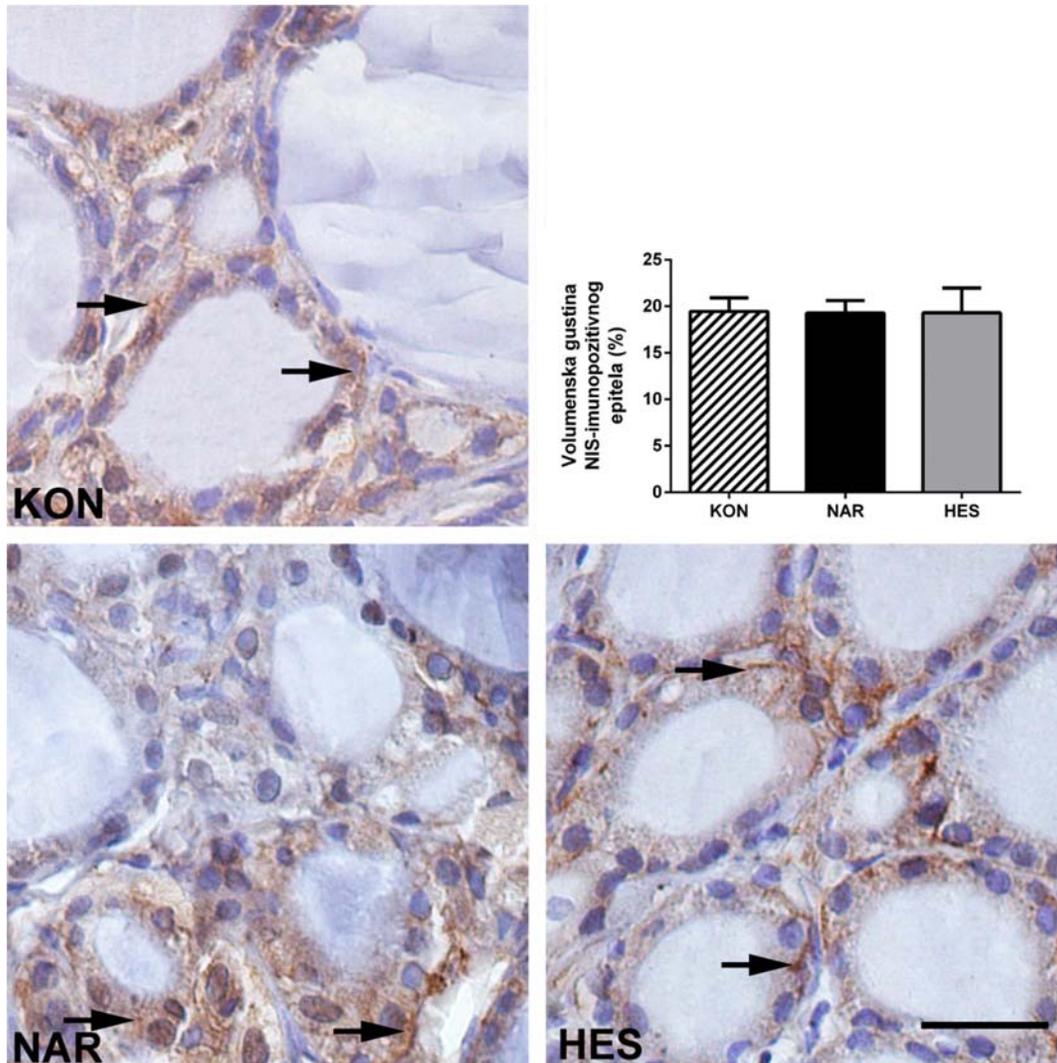
Slika 4.17 Imunofluorescentna ekspresija tiroksina vezanog za tiroglobulin (T_4 -Tg) u štitastoj žlezdi starih mužjaka pacova. KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Zeleni signal, T_4 -Tg; crveni signal, jedra kontrastirana propidijum jodidom. Bar – 25 μ m. Relativni intenzitet fluorescence (RIF). Rezultati predstavljaju aritmetičku srednju vrednost grupe \pm SD, $n=6$. ** $p < 0,01$.

NIS- imunopozitivnost slabog intenziteta lokalizovana je u citoplazmi većine tirocita (neaktivna forma kotransportera) folikula štitaste žlezde, dok je intenzivna bazolateralna ekspresija ovog proteina (aktivna forma) prisutna samo kod nekih folikula. Intenzivno obojeni folikuli su rasprostranjeni jedan do drugog tako da formiraju regione NIS- imunopozitivnosti u okviru tkiva štitaste žlezde MIKON grupe, koji su više zastupljeni u ovoj grupi u odnosu na SIKON životinje (Slika 4.18). Kod životinja SIKON i KON grupe, jaka imunopozitivnost se uočava samo na bazolateralnoj membrani folikula malih dimenzija (strelica; Slika 4.18 i 4.19). Kod folikula većih dimenzija NIS- imunopozitivnost prisutna je samo u citoplazmi ili je uopšte nema (vrh strelice; Slika 4.18 i 4.19), što ukazuje na smanjeni aktivni transport joda. Iako je NIS- imunopozitivnost prisutna u manjim folikulima SIKON grupe, kvantitativna analiza štitaste žlezde potvrdila je da je u MIKON grupi volumenska gustina NIS- imunopozitivnih folikula za 29% veća ($p < 0,05$) u odnosu na vrednost SIKON grupe (Slika 4.18).



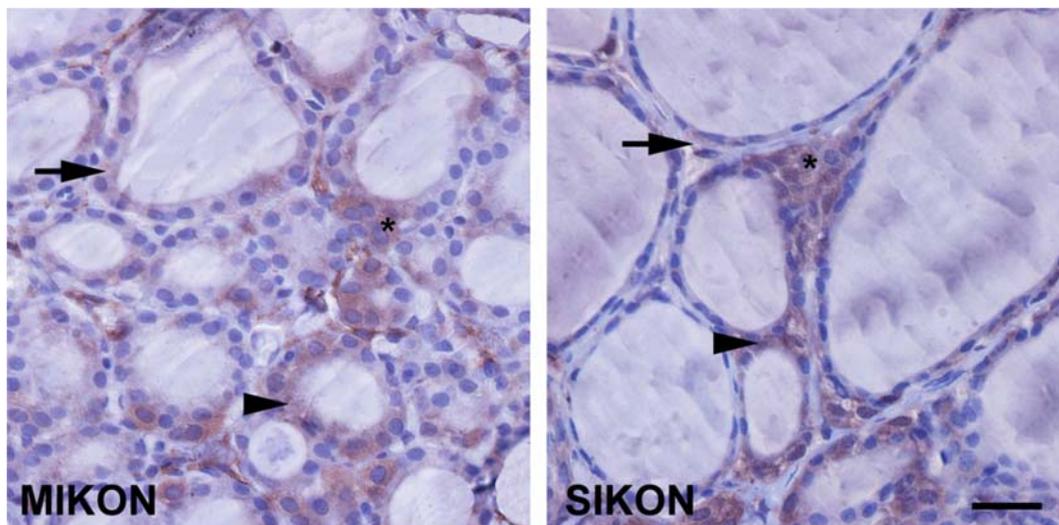
Slike 4.18 Imunohistohemijška ekspresija natrijum-jodidnog (Na^+/I) kotransportera u štitastoj žlezdi fiziološki intaktne kontrolne grupe mladih (MIKON) i fiziološki intaktne kontrolne grupe starih mužjaka pacova (SIKON). Strelica, bazolateralna imunopozitivnost; vrh strelice, citoplazmatska imunopozitivnost. Bar – 50 i 25 μm . Rezultat predstavlja aritmetičku srednju vrednost grupe \pm SD, $n=6$. * $p < 0,05$.

Tretman citrusnim flavanonima nije izazvao značajnu razliku u ekspresiji NIS u poređenju sa KON grupom životinja (Slika 4.19), dok je bazolateralna IHH NIS-
imunopozitivnost nešto niža nakon tretmana NAR (Slika 4.19).



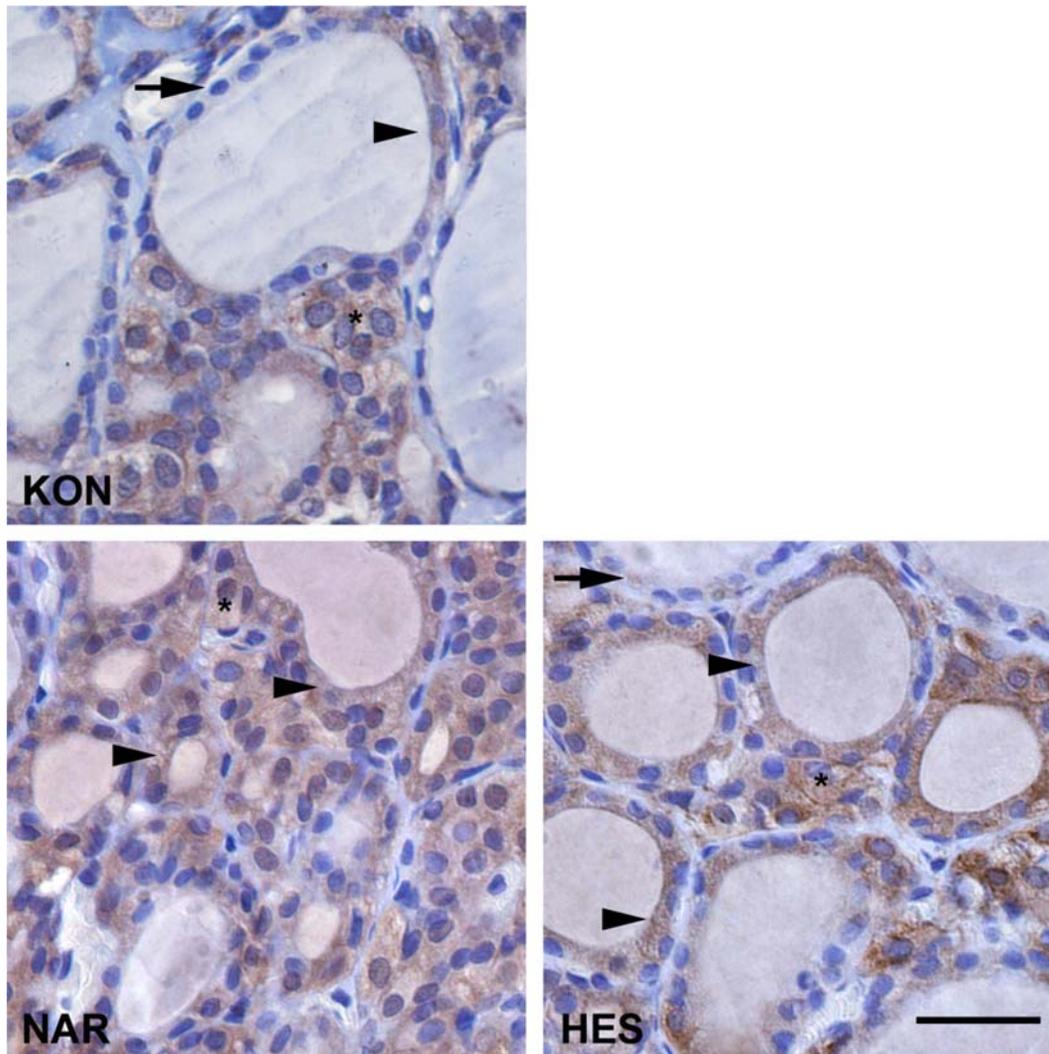
Slika 4.19 Imunohistohemijska ekspresija natrijum-jodidnog (Na^+/I^-) kotransportera u štitastoj žlezdi starih mužjaka pacova. KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Strelica, bazolateralna imunopozitivnost. Bar – 25 μm . Rezultat predstavlja aritmetičku srednju vrednju grupe \pm SD; $n=6$.

Imunohistohemijska ekspresija VEGF u štitastoj žlezdi MIKON grupe specifično je prisutna u citoplazmi folikuskog epitela i uočava se u većini folikula. Intenzitet VEGF-imunopozitivnosti varira između folikula: kod nekih je slabiji, a kod drugih jači (Slika 4.20). Heterogenost intenziteta VEGF imunopozitivnog signala uočava se čak i među tirocitima istog folikula (strelica; Slika 4.20). IHH VEGF-imunopozitivnost u štitastoj žlezdi SIKON i KON pacova prisutna je samo u folikulskom epitelu manjih, aktivnijih folikula, dok kod velikih, neaktivnih imunopozitivnost mestimično izostaje (Slika 4.20 i 4.21). Takođe, u štitastoj žlezdi obe eksperimentalne grupe (MIKON i SIKON), VEGF-imunopozitivnost se ne uočava samo u tirocitima, već je prisutna i u C ćelijama (zvezdica, Slika 4.20).



Slika 4.20 Imunohistohemijska ekspresija vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u štitastoj žlezdi fiziološki intaktne kontrolne grupe mladih (MIKON) i fiziološki intaktne kontrolne grupe starih mužjaka pacova (SIKON). Zvezdica, C ćelije; strelica, slabije obojen folikulski epitel; vrh strelice, jače obojen folikulski epitel. Bar - 25 μ m.

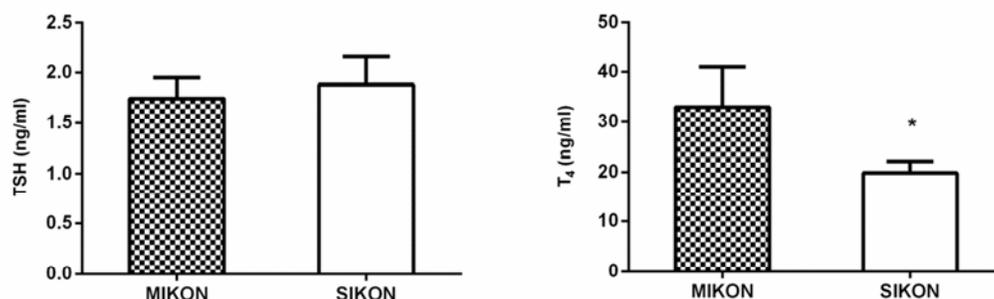
Nakon tretmana NAR imunopozitivnost se uočava u skoro svim folikulima, kako u malim, tako i u velikim (Slika 4.21). Imunopozitivnost je difuzno i heterogeno raspoređena u tirocitima folikuluskog epitela aktivnih folikula (strelica; Slika 4.21), što je u skladu s rezultatima dobijenim za ekspresiju ostalih proteina. VEGF ekspresija se nakon tretmana HES uočava u folikuluskom epitelu većine folikula, iako su prisutni folikuli koji su ostali VEGF-imunonegativni (Slika 4.21). Osim u epitelu, u obe eksperimentalne grupe, VEGF-imunopozitivnost je prisutna i u C ćelijama koje se nalaze između folikula (zvezdica; Slika 4.21).



Slika 4.21 Imunohistohemijska ekspresija vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u štitastoj žlezdi starih mužjaka pacova. KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Zvezdica, C ćelije; strelica, slabije obojen folikuluski epitel; vrh strelice, jače obojen folikuluski epitel. Bar - 25 μ m.

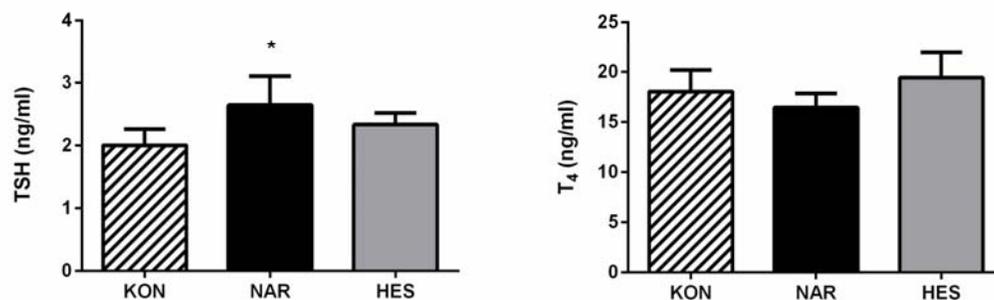
4.5. Koncentracija tirostimulirajućeg hormona i ukupnog tiroksina u serumu

Koncentracija TSH u serumu MIKON grupe pacova iznosila je 1.74 ± 0.2 ng/ml (Slika 4.22). Nivo ukupnog T_4 u cirkulaciji MIKON životinja iznosio je 32,99 ng/ml. U poređenju s ovom grupom, koncentracija ukupnog tiroksina u serumu SIKON životinja značajno je snižena i to za 40% ($p < 0,05$) (Slika 4.22).



Slika 4.22 Koncentracije tirostimulirajućeg hormona (TSH) i ukupnog tiroksina (T_4) u serumu pacova fiziološki intaktne kontrolne grupe mladih (MIKON) i fiziološki intaktne kontrolne grupe starih mužjaka pacova (SIKON). Rezultati predstavljaju aritmetičku srednju vrednost grupe \pm SD; $n=6$. * $p < 0,05$.

Vrednost TSH u serumu KON životinja je iznosila 2,01 ng/ml (Slika 4.23). Nakon tretmana citrusnim flavanonima, koncentracija TSH u cirkulaciji se povećala samo nakon aplikacije NAR i to za 32% ($p < 0.05$; Slika 4.23) u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Što se tiče koncentracije T_4 u cirkulaciji, ona je ostala nepromenjena nakon oba tretmana u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Slika 4.23).



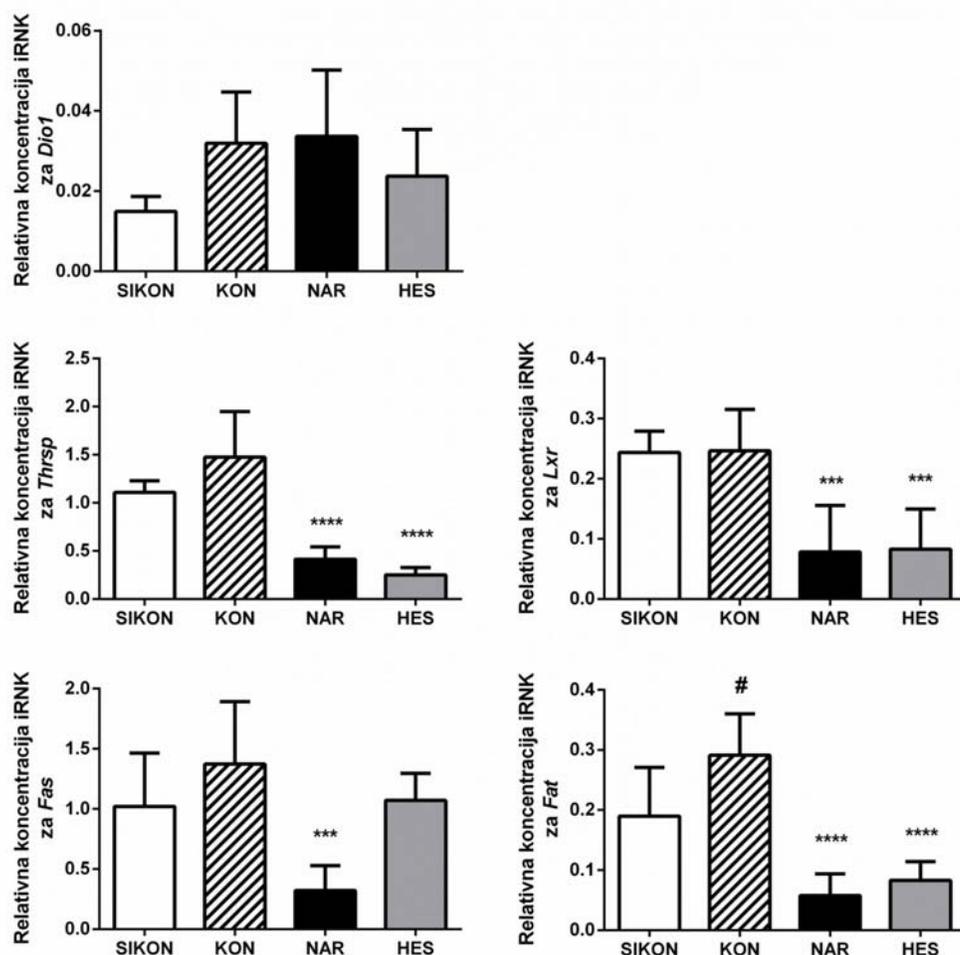
Slika 4.23 Koncentracija tirostimulirajućeg hormona (TSH) i ukupnog tiroksina (T_4) u serumu starih mužjaka pacova. KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost grupe \pm SD; $n=6$. * $p < 0,05$.

4.6. Uticaj citrusnih flavanona na relativnu koncentraciju iRNK gena regulisanih trijodtironinom u jetri starih pacova

Analiza relativne koncentracije iRNK regulisanih trijodtironinom prikazana je na Slici 4.24. U grupi tretiranoj suncokretovim uljem statistički značajno je snižena koncentracija gena *Fat*, i to 1,5 puta ($p < 0,05$; Slika 4.24) u poređenju sa vrednošću dobijenom za SIKON grupu. Kod ostalih ispitivanih gena nije došlo do promene relativnog nivoa iRNK u odnosu na odgovarajuće vrednosti SIKON grupe.

U poređenju sa vrednostima dobijenim za KON grupu životinja, tretman NAR smanjio je relativnu koncentraciju iRNK sledećih gena: *Thrsp* 3,5 puta ($p < 0,0001$), *Lxr* 3 puta ($p < 0,001$), *Fas* 3,5 puta ($p < 0,001$) i *Fat* 4 puta ($p < 0,0001$; Slika 4.24). Relativna koncentracija *Dio1* gena je ostala nepromenjena nakon tretmana NAR.

S druge strane, nakon tretmana HES statistički značajno su snižene relativne koncentracije iRNK sledećih gena: *Thrsp* 4 puta ($p < 0,0001$), *Lxr* 3 puta ($p < 0,001$) i *Fat* 3,5 puta ($p < 0,0001$; Slika 4.24). Relativna koncentracija iRNK *Dio1* i *Fas* gena nije promenjena u odnosu na vrednosti KON grupe životinja.



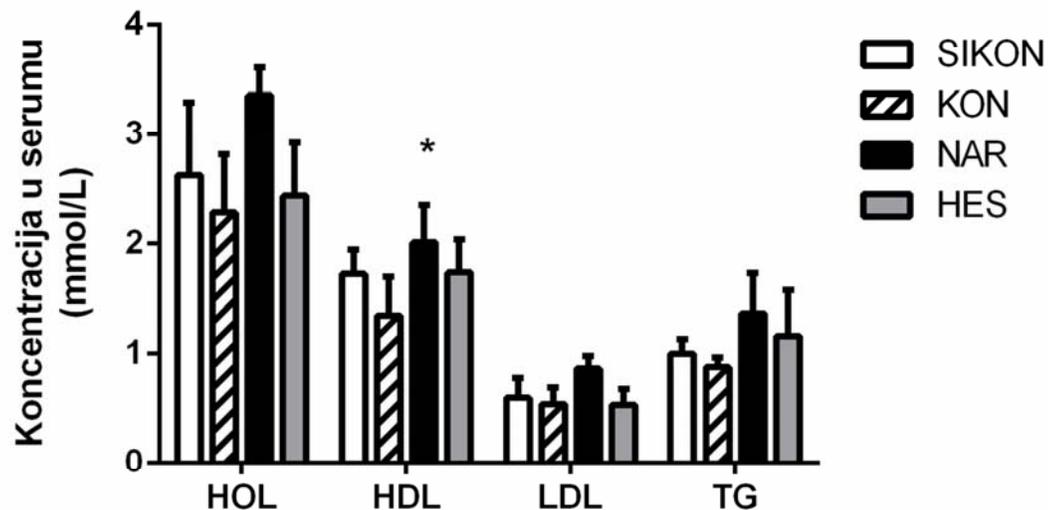
Slika 4.24 Relativna koncentracija iRNK za dejodinu tip 1 (*Dio1*), *Thrsp*, *Lxr*, sintazu masnih kiselina (*Fas*) i translokazu masnih kiselina (*Fat*) u jetri starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Relativna koncentracija iRNK je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za *Hprt* kao endogenu kontrolu. Rezultati su prikazani kao aritmetička srednja vrednost grupe \pm SD; n=6. *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$ u odnosu na KON; # $p < 0,05$ u odnosu na SIKON.

4.7. Biohemijski parametri u serumu pacova tretiranih citrusnim flavanonima

Koncentracija ukupnog holesterola (HOL), HDL, LDL i triglicerida prikazana je na Slici 4.25.

Analiza parametara lipidnog statusa u serumu pokazala je da prosečna koncentracija HOL u serumu SIKON grupe iznosi $2,63 \pm 0,67$ mmol/L, HDL $1,73 \pm 0,22$ mmol/L, LDL $0,6 \pm 0,18$ mmol/L (Slika 4.25), a prosečna koncentracija ukupnih triglicerida u serumu $1,0 \pm 0,13$ mmol/L (Slika 4.25).

Nakon tretmana suncokretovim uljem, prosečna koncentracija HOL, HDL, LDL i triglicerida nije značajno izmenjena (Slika 4.25).



Slika 4.25 Koncentracija ukupnog holesterola (HOL), HDL, LDL i triglicerida (TG) u serumu starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost grupe \pm SD; n=6. * p < 0,05.

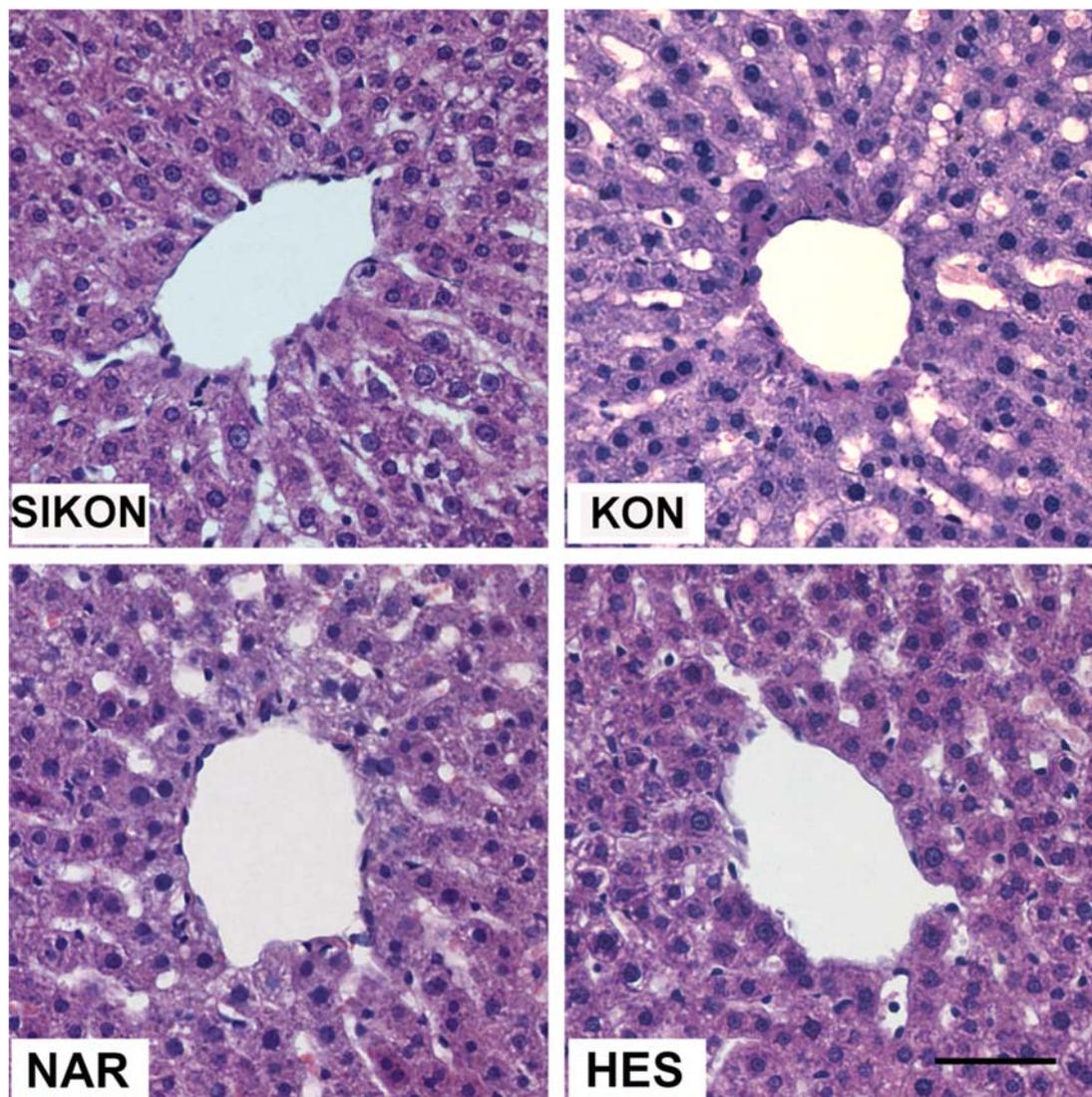
Nakon tretmana starih mužjaka pacova NAR, prosečna koncentracija HOL, LDL i ukupnih triglicerida nije značajno izmenjena dok je vrednost HDL povišena za 48% (p < 0,05; Slika 4.25) u odnosu na KON životinje.

Tretman HES nije značajno promenio parametre lipidnog statusa u serumu starih mužjaka pacova u poređenju sa vrednostima iz KON grupe (Slika 4.25).

4.8. Histološke karakteristike jetri starih pacova tretiranih citrusnim flavanonima

Tkivo jetre SIKON i KON grupe odlikuje se urednom radijalnom organizacijom hepatocita, bez vidljivih hepatocelularnih oštećenja (Slika 4.26). Nisu uočene nekrotske, apoptotske ili hepatotoksične promene, jedino su vidljive mestimične balonirajuće degeneracije hepatocita. Ne uočavaju se ni tragovi masnih kapi u parenhimu, koje bi ukazivale na eventualno prisustvo steatoze u jetri pacova ovog starosnog uzrasta (Slika 4.26). Parenhim jetre je bez prisustva krvnih elemenata, fibroze ili pokazatelja inflamacije (Slika 4.26).

Nakon tretmana citrusnim flavanonima tkivo jetre pokazuje uredan histopatološki nalaz, bez vidljivih histopatoloških promena (Slika 4.26).



Slika 4.26 Poprečni presek jetre starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Bar – 50 μm .

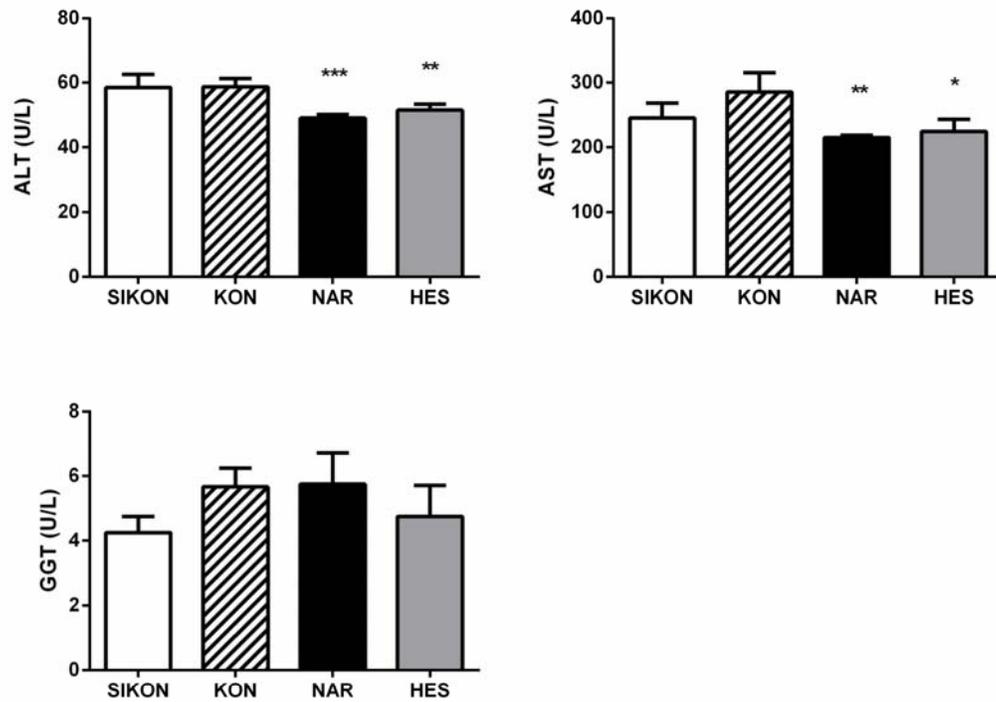
4.9. Koncentracija enzima jetre u serumu

Prosečna koncentracija ALT, AST i GGT kod SIKON grupe životinja iznosila je $58,5 \pm 4,95$ U/L, $245 \pm 23,39$ U/L i $4,25 \pm 0,5$ U/L (Slika 4.27).

Koncentracija ovih enzima u serumu KON životinja nije značajno promenjena u odnosu na SIKON grupu. Prosečne vrednosti merenih parametara iznosile su $58,67 \pm 2,89$ U/L za ALT, $285,33 \pm 30,04$ U/L za AST i $5,67 \pm 0,58$ U/L za GGT (Slika 4.27).

Nakon tretmana NAR koncentracija ALT i AST u serumu bila je niža za 12% ($p < 0,001$) i 25% ($p < 0,01$), u poređenju sa odgovarajućim vrednostima KON grupe (Slika 4.27). Vrednost GGT nije bila promenjena.

Nakon tretmana HES, statistički značajno su smanjene vrednosti ALT i AST i to za 12% ($p < 0,01$) i 16% ($p < 0,05$), u odnosu na vrednosti dobijene za KON životinje (Slika 4.27). Koncentracija GGT u serumu posle tretmana HES nije statistički značajno izmenjena.



Slika 4.27 Koncentracija alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST) i gama-glutamil transpeptidaze (GGT) u serumu starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost grupe \pm SD; $n=6$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$.

4.10. Masnokiselinski profil fosfolipida membrane hepatocita u jetri pacova tretiranih citrusnim flavanonima

Profil masnih kiselina fosfolipida membrane u jetri starih pacova prikazan je u Tabeli 4.2. Ukupne vrednosti SFA, MUFA i PUFA predstavljene su na Slici 4.28, dok su ukupne vrednosti n-3, n-6, kao i njihov međusobni odnos grafički predstavljeni na Slici 4.29.

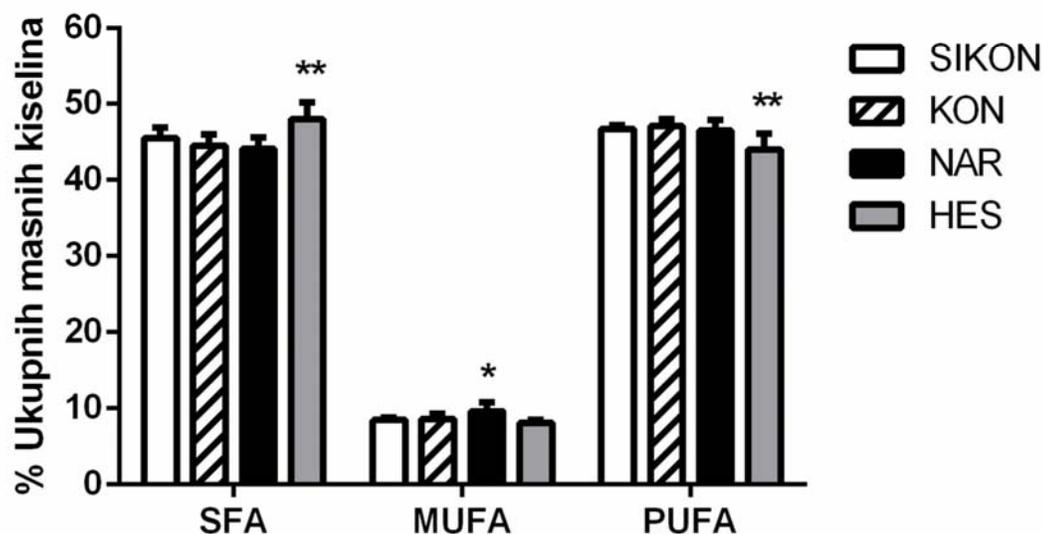
Tabela 4.2 Profili masnih kiselina fosfolipida hepatocita starih pacova u kontrolnim grupama, fiziološki intaktnoj kontrolnoj (SIKON) i kontrolnoj grupi tretiranoj suncokretovim uljem (KON), kao i hepatocita starih mužjaka pacova nakon tretmana naringeninom (NAR) i hesperetinom (HES).

		Masna kiselina (%)	SIKON	KON	NAR	HES
S F A	Palmitinska	C16:00	22±0,38	19,86±1,02	21,7±0,99*	22,81±1,35*
	Stearinska	C18:00	23,5±1,54	24,68±2,49	23,22±1,81	23,98±2,4
M U F A	Palmitooleinska	C16:1n-7	0,64±0,25	0,72±0,2	0,62±0,1*	0,5±0,08*
	Oleinska	C18:1n-9	4,25±0,08	4,57±0,18	4,40±0,48	4,13±0,33*
	Vakcenska	C18:1n-7	3,62±0,24	3,42±0,46	4,03±0,31*	3,57±0,35
P U F A	Linolna	C18:2n-6	14,8±0,7	17,3±2,03 [#]	15,2±0,88*	14,6±0,81*
	DGLA	C20:3n-6	0,91±0,19	0,96±0,05	0,81±0,16*	0,63±0,07*
	Arahidonska	C20:4n-6	22,6±0,82	20,96±1,27	21,26±1,42	20,76±1,14
	Adreninska	C22:4n-6	0,36±0,03	0,27±0,04 [#]	0,31±0,03*	0,36±0,09*
	Linoleinska	C18:3n-3	0,13±0,01	0,14±0,02	0,14±0,02	0,12±0,02*
	EPA	C20:5n-3	0,32±0,08	0,6±0,14 [#]	0,27±0,06*	0,15±0,07*
	DPA	C22:5n-3	1,03±0,13	1,03±0,16	1,04±0,17	0,97±0,17
DHA	C22:6n-3	6,00±0,46	6,02±0,86	7,72±0,8*	7,29±1,06*	

Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost grupe ± SD; n=6. * p < 0,05 u odnosu na KON; # p < 0,05 u odnosu na SIKON.

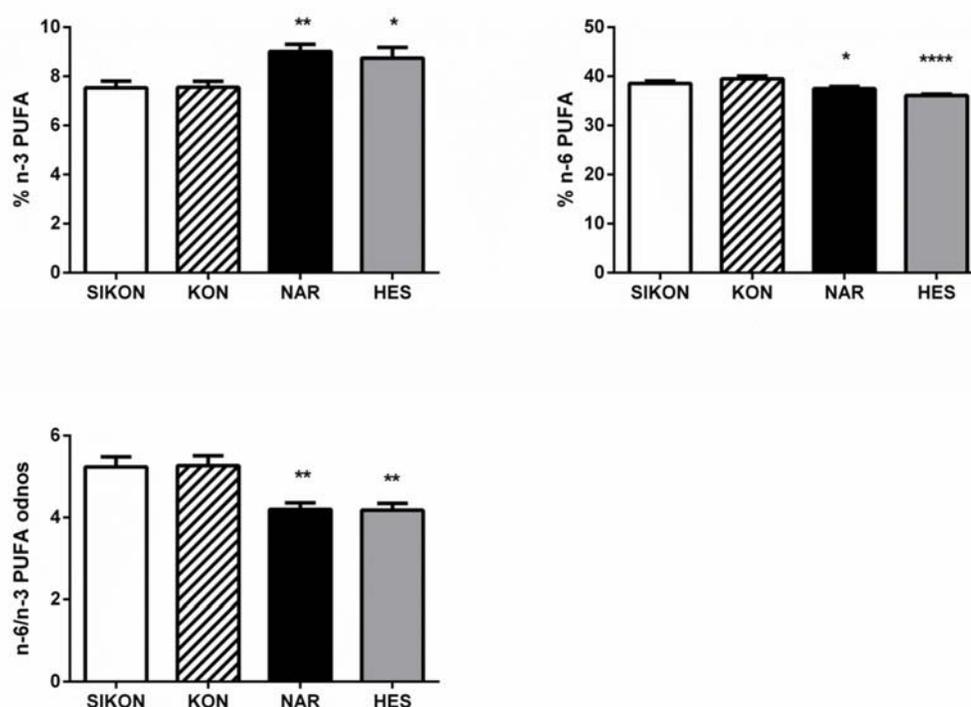
Kao posledica korišćenja suncokretovog ulja kao rastvarača uočeno je povećanje ($p < 0,05$) zastupljenosti C18:2 n-6 i C20:5 n-3 masnih kiselina, kao i smanjenja ($p < 0,05$) sadržaja C22:4 n-6 masne kiseline u poređenju sa SIKON grupom (Tabela 4.2).

U poređenju sa KON grupom, hronični tretman NAR statistički značajno je povisio ukupan sadržaj MUFA ($p < 0,05$), ali nije izazvao promene u zastupljenosti ukupnih SFA i PUFA (Slika 4.28). Sadržaj C16:0, C18:1n-7, C22:4n-6 i C22:6n-3 masnih kiselina se povećao ($p < 0,05$), dok se sadržaj C16:1n-7, C18:2n-6, C20:3n-6 i C20:5n-3 smanjio ($p < 0,05$) nakon tretmana NAR. NAR je statistički značajno smanjio ($p < 0,05$) sadržaj ukupnih n-6 PUFA, kao i n-6/n-3 odnos ($p < 0,01$), dok je s druge strane povećao ($p < 0,01$) ukupni sadržaj n-3 PUFA u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Slika 4.29).



Slika 4.28 Procenat (%) ukupnih zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih (PUFA) masnih kiselina fosfolipida u hepatocitima starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost grupe \pm SD; n= 6. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

Tretman HES je u poređenju sa KON statistički značajno povisio ($p < 0,01$) SFA, snizio ($p < 0,01$) PUFA, dok je sadržaj MUFA ostao nepromenjen (Slika 4.28). U HES grupi sadržaj C16:0, C22:4n-6 i C22:6n-3 je povećan ($p < 0,05$), dok je smanjen ($p < 0,05$) sadržaj C16:1n-7, C18:1n-9, C18:2n-6, C20:3n-6, C18:3n-3 i C20:5n-3 u poređenju sa KON. Sadržaj C18:0, C18:1n-7, C20:4n-6 i C22:5n-3 nije promenjen nakon tretmana sa HES (Tabela 4.2). U odnosu na kontrolne vrednosti HES je statistički značajno smanjio ($p < 0,0001$) ukupne n-6 PUFA i odnos n-6/n-3 PUFA ($p < 0,01$), ali je povećao ($p < 0,01$) sadržaj ukupnih n-3 PUFA (Slika 4.29).



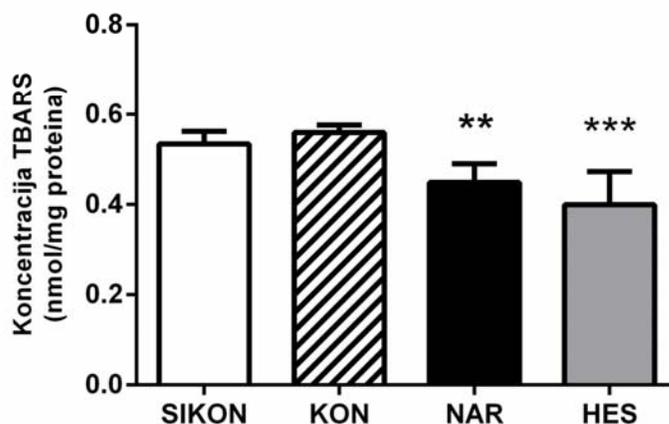
Slika 4.29 Procenat (%) n-3, n-6, kao i odnosa n-6 / n-3 polinezasićenih masnih kiselina fosfolipida jetre starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost grupe \pm SD; n=6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i **** $p < 0,0001$.

4.11. Koncentracija reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline u jetri starih pacova

Koncentracija TBARS u jetri intaktnih (SIKON) pacova je iznosila $0,53 \pm 0,03$ nmol/mg proteina (Slika 4.30). Kod starih životinja tretiranih suncokretovim uljem (KON) vrednost TBARS u jetri iznosila je $0,56 \pm 0,02$ nmol/mg proteina (Slika 4.30). Nije došlo do promena u nivou TBARS u odnosu na SIKON grupu.

Međutim, nakon administracije oba citrusna flavanona došlo je do smanjenja (Slika 4.30) koncentracije TBARS u jetri starih pacova. Kod životinja tretiranih NAR koncentracija TBARS u jetri je opala za 20% ($p < 0,01$; Slika 4.30) u odnosu na KON vrednosti.

Kao i u slučaju NAR, u jetrama životinja tretiranih HES, koncentracija TBARS je opala za 29% ($p < 0,001$; Slika 4.30) u poređenju sa vrednostima dobijenim za KON životinje.



Slika 4.30 Koncentracija reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (TBARS) u jetri starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost grupe \pm SD; $n=6$. ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$.

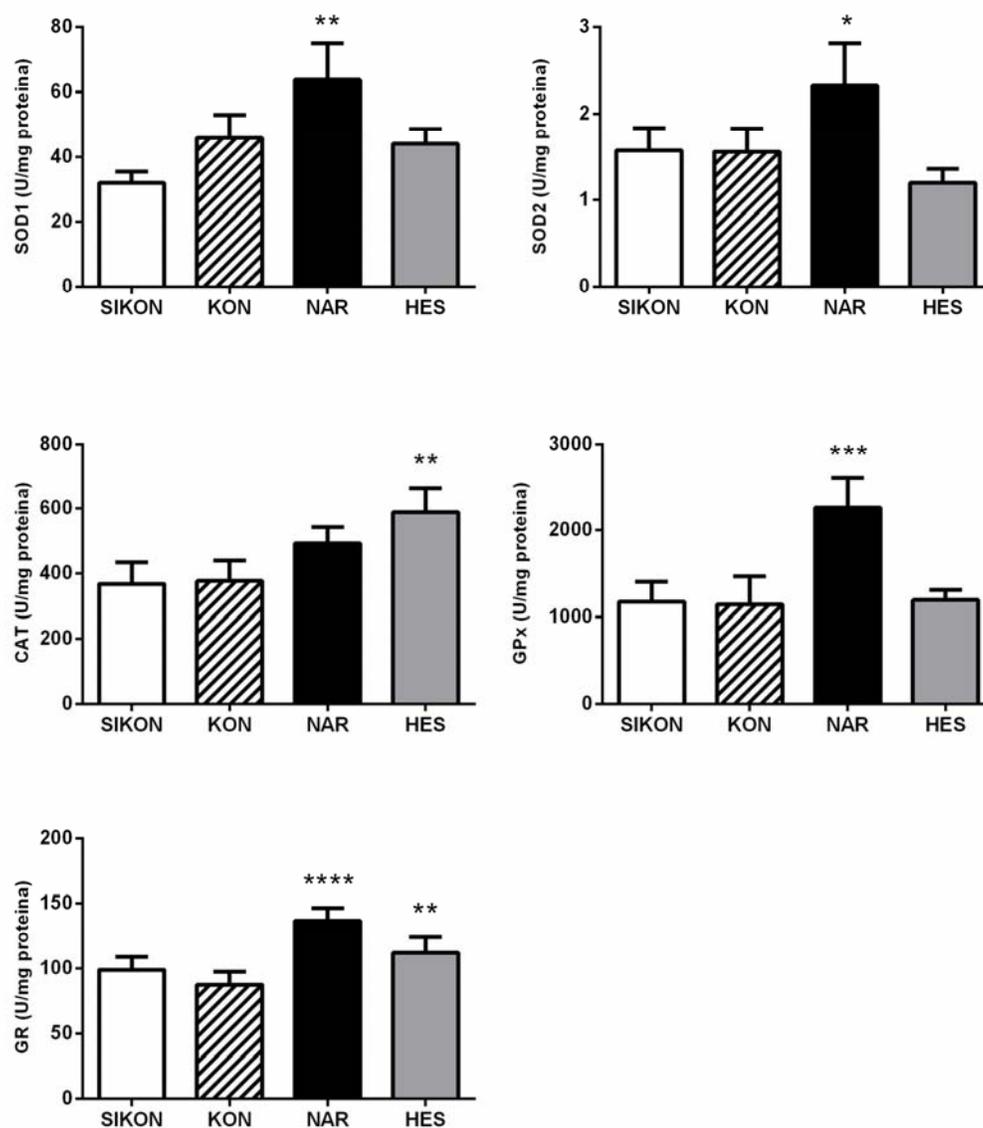
4.12. Parametri antioksidativnog statusa u jetri pacova tretiranih citrusnim flavanonima

4.12.1. Aktivnost antioksidativnih enzima

Suncokretovo ulje (KON) nije dovelo do značajnih promena aktivnosti antioksidativnih enzima (AOE) u poređenju sa vrednostima dobijenim za SIKON (Slika 4.31).

Tretman citrusnim flavanonima uticao je na aktivnost antioksidativnih enzima u jetri starih pacova. NAR je povećao aktivnost ($p < 0,05$) skoro svih ispitivanih AOE, sem CAT, u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Slika 4.31). Enzimska aktivnost SOD1 i SOD2 je porasla za 30% ($p < 0,01$ i $p < 0,05$), dok su aktivnosti GPx i GR porasle za 97% ($p < 0,001$) i 56% ($p < 0,0001$). Aktivnost CAT je takođe bila povećana, ali ova promena nije dostigla statističku značajnost ($p=0,069$).

U jetri pacova starih 24 meseca nakon tretmana HES došlo je do povećanja enzimske aktivnosti CAT za 56% ($p < 0,01$) i GR za 28% ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Slika 4.31). Ipak, HES nije izazvao promenu aktivnosti ostalih ispitivanih AOE (Slika 4.31).



Slika 4.31 Aktivnost enzima superoksid dismutaze 1 (SOD1), superoksid dismutaze 2 (SOD2), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze (GR) u jetri starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Rezultati predstavljaju aritmetičku srednju vrednost grupe \pm SD; n=6. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 i **** p < 0,0001.

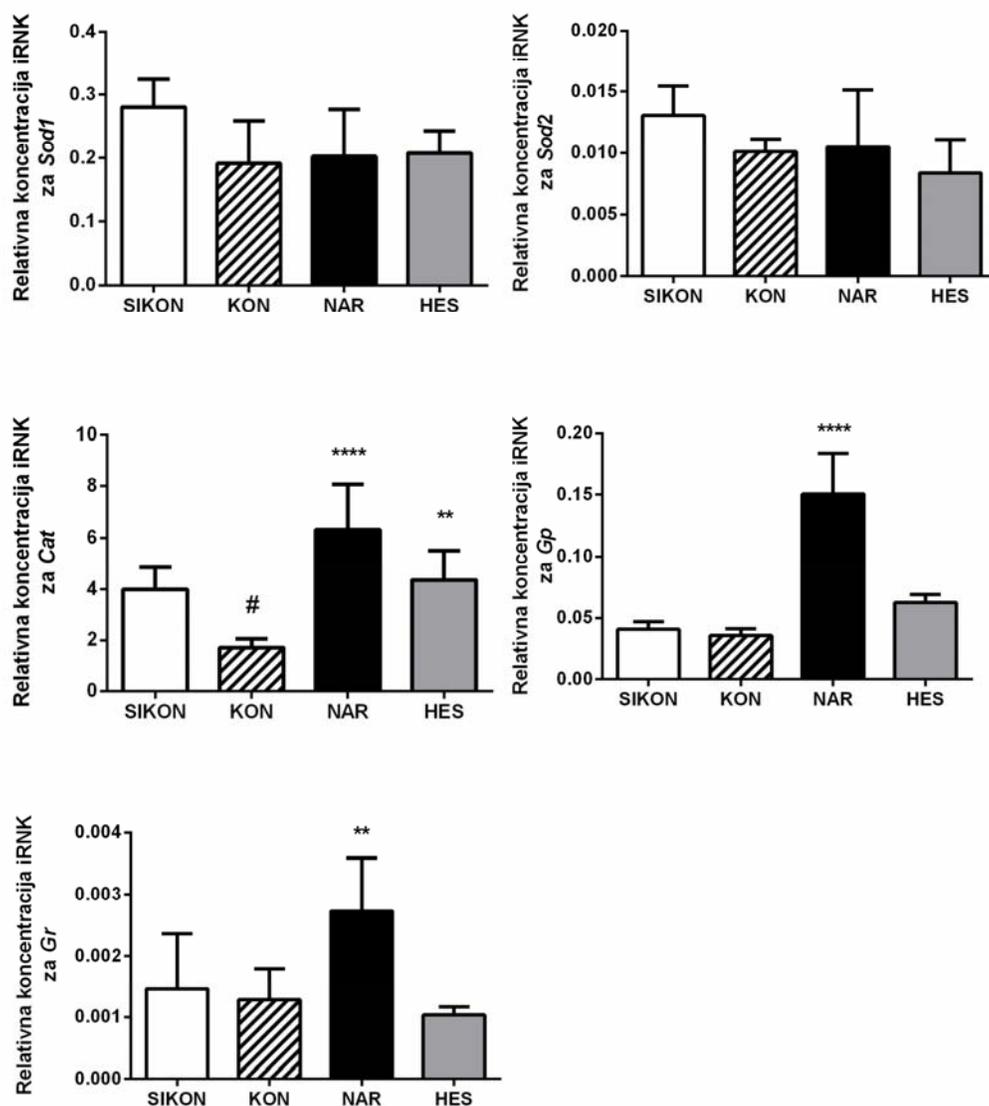
4.12.2. Analiza relativne genske ekspresije antioksidativnih enzima

Vrednosti relativne genske ekspresije AOE predstavljene su na Slici 4.32.

Genska ekspresija enzima *Sod1*, *Sod2*, *Gpx* i *Gr* je ostala nepromenjena nakon administracije suncokretovog ulja, osim u slučaju *Cat* gena, kod kojeg je u poređenju sa SIKON grupom došlo do statistički značajnog smanjenja njegove ekspresije za 2 puta ($p < 0,05$; Slika 4.32).

U poređenju sa KON vrednostima, NAR je povećao gensku ekspresiju *Cat* 3,4 puta ($p < 0,0001$), *Gpx* 6,7 ($p < 0,0001$) i *Gr* 1,3 puta ($p < 0,01$; Slika 4.32). Relativna genska ekspresija *Sod1* i *Sod2* nije statistički značajno promenjena nakon tretmana NAR.

Tretman HES uticao je samo na povećanje ($p < 0,01$; Slika 4.32) genske ekspresije *Cat* i to za 2,9 puta, dok genska ekspresija ostalih enzima nije značajno promenjena u poređenju sa KON vrednostima (Slika 4.32).



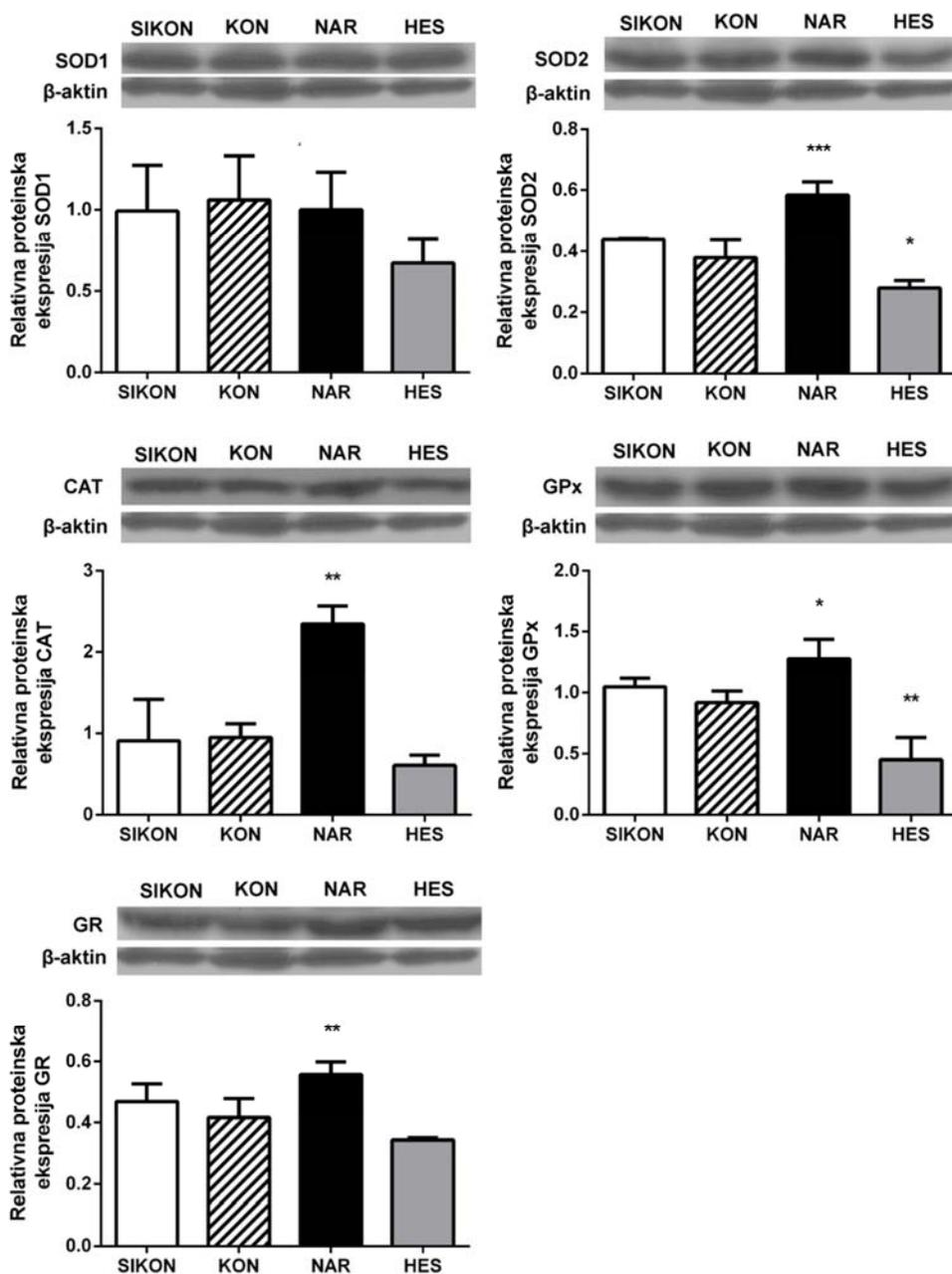
Slika 4.32 Relativna koncentracija iRNK za superoksid dismutazu 1 (*Sod1*), superoksid dismutazu 2 (*Sod2*), katalazu (*Cat*), glutation peroksidazu (*Gpx*) i glutation reduktazu (*Gr*) u jetri starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Relativna koncentracija iRNK je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za *Gapdh* kao endogenu kontrolu. Rezultati predstavljaju aritmetičku srednju vrednost grupe \pm SD; n=6. ** p < 0,01 i **** p < 0,0001 u odnosu na KON; # p < 0,05 u odnosu na SIKON.

4.12.3. Analiza relativne proteinske ekspresije antioksidativnih enzima

Promene u proteinskoj ekspresiji enzima antioksidativne zaštite nakon administracije citrusnih flavanona prikazani su na Slici 4.33. Tretman suncokretovim uljem nije značajno promenio vrednosti ispitivanih parametara u poređenju sa vrednostima dobijenim za SIKON grupu.

Analizom proteinskih profila nakon tretmana NAR, uočeno je da dolazi do povećane proteinske ekspresije SOD2, CAT, GPx i GR enzima i to za 51% ($p < 0,001$), 148% ($p < 0,001$), 32% ($p < 0,05$) i 34% ($p < 0,001$), u odnosu na kontrolu (Slika 4.33). NAR nije promenio relativne proteinske ekspresije enzima SOD1 (Slika 4.33).

S' druge strane, za razliku od proteinskih profila dobijenih nakon tretmana NAR, HES je smanjio proteinsku ekspresiju enzima SOD2 i GPx i to za 28% ($p < 0,05$) i 51% ($p < 0,01$), u poređenju sa količinom ovih enzima detektovanih kod KON životinja (Slika 4.33). Relativna proteinska ekspresija SOD1, CAT i GR enzima je ostala nepromenjena nakon tretmana HES (Slika 4.33).



4.33 Relativna proteinska ekspresija superoksid dismutaze 1 (SOD1), superoksid dismutaze 2 (SOD2), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze (GR) u jetri starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Relativna ekspresija proteina AOE je izračunata u odnosu na ekspresiju proteina za aktin kao endogenu kontrolu. Rezultati predstavljaju aritmetičku srednju vrednosti grupe \pm SD; n=6. * p < 0,05, ** p < 0,01 i *** p < 0,001.

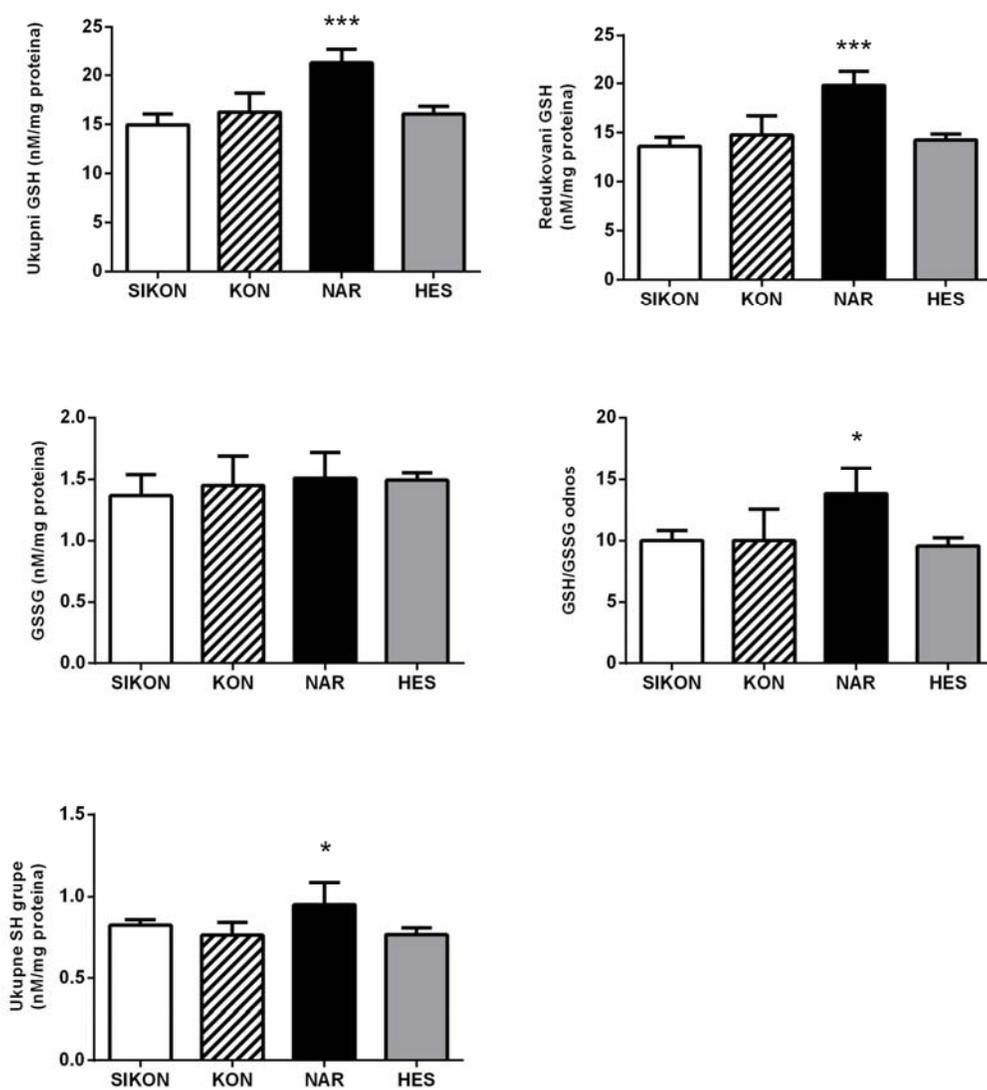
4.13. Parametri redoks ravnoteže

Parametri redoks ravnoteže predstavljeni su na Slici 4.34.

Nakon tretmana suncokretovim uljem, nije uočena razlika između vrednosti ispitivanih parametara u poređenju sa SIKON životinjama (Slika 4.34).

Nakon tretmana NAR, koncentracija ukupnog GSH povišena je za 28% ($p < 0,001$), redukovanog GSH za 31% ($p < 0,001$), kao i odnosa GSH/GSSG za 26% ($p < 0,05$; Slika 4.34). Tretman nije imao efekta na vrednosti GSSG (Slika 4.34). Sadržaj ukupnih sulfhidrilnih grupa GSH je povećan za 24% ($p < 0,05$) u poređenju sa KON vrednostima (Slika 4.34).

Nije uočena promena nijednog od ispitivanih parametara redoks ravnoteže nakon tretmana HES (Slika 4.34).



Slika 4.34 Redoks ravnoteža: ukupni glutation (GSH), redukovani GSH, oksidovani GSH (GSSG), odnos GSH/GSSG i ukupnih sulfhidrilnih (SH) grupa GSH u jetri starih mužjaka pacova. SIKON, fiziološki intaktna kontrolna grupa; KON, kontrolna grupa tretirana suncokretovim uljem; NAR, grupa tretirana naringeninom; HES, grupa tretirana hesperetinom. Rezultati predstavljaju aritmetičku srednju vrednost grupe ± SD; n = 6. * p < 0,05 i *** p < 0,001.

5. DISKUSIJA

Starenje predstavlja prirodan fenomen karakterističan za sve ćelije i organizme. Počinje kada se u ćeliji akumuliraju mutacije i oksidativna oštećenja koja dovode do prestanka normalne fiziologije ćelije i razvoja senescentnog fenotipa (Yang i sar., 2016; Thomas i sar., 2016; Pan i sar., 2016; Ziegler i sar., 2015). Iako starenje nije bolest *per se*, ono je glavni uzrok nastanka svih hroničnih oboljenja.

Gubljenjem koštane mase nastaje osteoporoza, opadanjem snage mišića nastaje sarkopenija, usporavanjem metabolizma razvijaju se dislipidemije i metabolički sindrom (Chahal i Drake, 2007; De Minicis et al., 2013; Sullivan-Gunn i Lewandowski, 2013). Uz to, slabi centralna regulacija endokrinih osovina a menja se odgovor perifernih organa na endokrine stimuluse (Bowers i sar., 2013). Sve zajedno, to utiče na kvalitet života u staroj dobi. Koncept zdravog starenja predstavlja niz aktivnosti koje u ovom životnom dobu doprinose očuvanju kvaliteta života i svih njegovih aspekata (Hansen-Kyle, 2005; Peel i sar., 2005). Korišćenje polifenolnih susptanci u koje spadaju citrusni flavanoni može delovati preventivno ili usporiti nastanak bolesti kod starih (Chanet i sar., 2012; Mulvihill i sar., 2009, 2014, 2016).

Cilj ove doktorske disertacije bio je da rasvetli da li naringenin (NAR) i hesperetin (HES) utiču na tiroidnu homeostazu, lipidni i antioksidativni status starih pacova. U ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je model prirodno ostarelih mužjaka pacova starosti 24 meseca, koji odgovara starosnom dobu oko 65 godina kod ljudi (Sengupta, 2013). Mužjaci pacova su u odnosu na ženke osetljiviji na dejstvo ksenobiotika na tiroidnu homeostazu usled višeg TSH, što ih čini podesnijim modelom za ovaj tip istraživanja (Capen, 1997; Schmucker, 2005). Takođe, stari mužjaci imaju oslabljen detoksikacioni mehanizam u jetri u odnosu na mlade mužjake (Lee i sar., 2011).

Sa starenjem se povećava učestalost oboljenja štitaste žlezde kod ljudi (Boelart, 2013). Za razliku od pacova, oboljenja su učestalija kod žena, ali kada se razvije malignitet štitaste žlezde kod muškaraca, invazitet je veći a prognoza toka bolesti lošija (Sajid-Crockett, 2000). Takođe, učestalost kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti sa starenjem raste kod oba pola, ali je nešto veća kod muškaraca (Vijay i sar., 2015; Ghezzi i sar., 2012), što je bio dodatan motiv za *in vivo* ispitivanja efekata citrusnih flavanona u ovom eksperimentalnom modelu.

U našim eksperimentima, citrusni flavanoni NAR i HES su aplikovani *per os* kako bi tretman bio nutritivno relevantan i mogao da se uporedi sa unosom citrusnih flavanona

putem hrane i pića kod ljudi. Ovakav eksperimentalni pristup i način administracije izabran je i da bi se izbegla gavaža, imajući u vidu da mikrobiota u ustima ima značajnu ulogu u inicijalnom metabolizmu polifenola (Chanet i sar., 2012).

Flavanoni se u ljudskoj ishrani isključivo unose putem konzumiranja citrusnog voća i sokova. Istraživanja su pokazala da kod ljudi dnevna upotreba flavanona putem hrane iznosi 2,7 do 78 mg (Chanet i sar., 2012). Alometrijskim kalkulacijama (West i Brown, 2005) je proračunato da primenjena doza od 15 mg/kg t.m. kod pacova odgovara dozi od 4,4 mg/kg t.m. kod ljudi. Ova količina flavanona može se naći u 0,2-1 L soka od grejpfruta ili pomorandže (Chanet i sar., 2012; Khan i sar., 2014). Flavanoni su davani u formi aglikona, a ne glikozida inače prisutnog u voću da bi se postigla biološki efektivna koncentracija primenjenih supstanci (Kanaze i sar., 2007).

Suncokretovo ulje je izabrano kao medijum za administraciju supstanci jer ono sadrži zanemarljivu količinu polifenola (Colquhoun i sar., 1996). Ostala ulja sadrže značajnu količinu polifenola koji bi mogli da interferiraju sa antioksidativnim i drugim osobinama NAR i HES (Khan i sar., 2014). Sem toga, suncokretovo ulje se učestalo koristi u ishrani ljudi iz ovog regiona (Istočna i Jugoistočna Evropa), a ulje je ukusna hrana za pacove, koje zbog svog neutralnog mirisa i ukusa „maskira“ gorak ukus flavanona. Ovo je omogućilo da životinje hranu uzimaju voljno, bez stresa tokom tretmana.

Sa starenjem je došlo do fiziološki očekivanog porasta telesne mase SIKON pacova; masa starih životinja, apsolutna masa i volumen štitaste žlezde viši su u odnosu na MIKON životinje dok je relativna masa štitaste žlezde ostala nepromenjena. Ovo je u skladu sa podacima Rao-Rupanagudi i sar. (1992) i očekivan je rezultat imajući u vidu da su pacovi životinje koje rastu celog života te porast telesne mase prati porast apsolutne mase žlezde dok njena relativna masa ostaje nepromenjena. Suncokretovo ulje nije imalo efekta na telesnu masu starih pacova tokom 4 nedelje tretmana. NAR ili HES nisu izazvali značajnu promenu telesne mase u našem eksperimentalnom modelu. Ipak, nekoliko studija je pokazalo da tretman polifenolima poput eriotricina (Fukuchi i sar., 2008) ili NAR (Ke i sar., 2015) značajno smanjuje telesne mase i akumulaciju masti kod miševa. Nedostatak upadljivijih rezultata nakon NAR ili HES tretmana na smanjenje telesne mase može da bude posledica korišćenja niske doze aplikovane supstance jer su drugi autori koristili doze u rasponu od 50 do 500 mg/kg t.m. ili dužine

trajanja tretmana, imajući u vidu dužinu trajanja od 6-12 nedelja u drugim eksperimentalnim studijama. Dodatno, nedostatak promena može biti uzrokovan životnim dobom životinja. Ovo zapažanje je u skladu sa progresivnim padom koncentracije testosterona i slabljenjem anaboličkog efekta ovog hormona sa starenjem u našem eksperimentalnom modelu (Zirkin i Tenover, 2012).

U štitastoj žlezdi SIKON pacova prisutne su folikulske ciste i hiperplazija C ćelija. Ovo je u skladu sa rezultatima Martin-Lacave i sar. (1992), ali za razliku od rezultata ovih autora, zastupljenost vezivnog tkiva se nije povećala u odnosu na MIKON grupu. U parenhimu stare žlezde uočavaju se prazni folikuli i ultimobranhijalne ciste, bez inflamatornih reakcija i akumulacije masnih kapi, što je u skladu s rezultatima Rao-Rupanagudi i sar. (1992) i Lee i sar. (2016).

Nakon aplikacije citrusnih flavanona nismo uočili hipertrofiju tkiva, kao ni infiltraciju imunskih ćelija. Ipak, tretman različitim flavonoidima, kao što je viteksin iz prosa (Mennen i sar. 2005) ili sojini izoflavoni u kombinaciji s nedostatkom joda (Hirose i sar., 2001) dovodi do povećanja mase štitaste žlezde, što nakon dužeg perioda može da rezultira razvojem gušavosti, autoimunskih oboljenja i/ili kancera štitaste žlezde (Boelaert, 2013; Vitale i sar., 2013).

Strukturni paramteri štitaste žlezde SIKON pacova razlikuju se u vrednostima apsolutnog volumena žlezde i pojedinačnih faza u odnosu na MIKON pacove. Dijametar folikula je veći i na periferiji i u centralnom delu žlezde SIKON pacova, ali se ne uočava razlika između njihovih relativnih odnosa. Međutim, sa starenjem se menja struktura žlezde *Miranda* i *Spague-Dawley* soja pacova - opada visina folikulskog epitela, dok raste dijametar folikulskog lumena i količina koloida (Rao-Rupanagudi i sar., 1992; Mariotti i sar., 1995; Moreira i sar., 2005). Ovo je važan podatak jer pokazuje da kod *Wistar* pacova u staroj dobi ne dolazi do promene u relativnim odnosima histoloških faza. Ova kvantitativna razlika je posledica razlike u apsolutnim volumenima između MIKON i SIKON pacova, tj. rezultat je povećanja mase žlezde, a ne uzajamnih odnosa histoloških faza.

U pređenju s KON životinjama, masa i apsolutni volumen štitaste žlezde nije bio promenjen nakon aplikacije citrusnih flavanona. Histološka analiza štitaste žlezde pokazuje smanjenje volumena koloida i povećanje intersticijuma nakon tretmana NAR i HES. Detektovane strukturne promene ukazuju na blagu promenu u ekonomiji TH,

najverovatnije izazvanu povišenim TSH u krvi, što je u skladu sa prethodnim rezultatima iz naše laboratorije o efektima sojinih flavonoida (Šošić-Jurjević i sar. 2010). Povećanje volumena intersticijuma može da bude rezultat povećane prokrvljenosti i širenja mikrocirkulacije oko aktivnih folikula. Poboljšana prokrvljenost angiofolikulskih jedinica primećena je nakon stimulacije TSH u različitim eksperimentalnim uslovima kod pacova (Colin i sar., 2013; Šošić-Jurjević i sar., 2015). Iako relativna volumenska gustina histoloških faza nije promenjena, ultrastrukturno se uočava razlika u strukturi ćelija folikulskog epitela SIKON pacova. U poređenju sa ultrastrukturom tirocita MIKON pacova, folikulski epitel SIKON životinja karakteriše se manjim brojem lizozoma i koloidnih kapi što ukazuje na smanjenu sekretornu aktivnost žlezde u odnosu na mlade pacove. Utvrđene strukturne i ultrastrukturne promene ukazuju na smanjenu produkciju TH, a u skladu su sa detektovanim sniženjem koncentracije T_4 u krvi.

Tretman citrusnim flavanonima uticao je na folikulski epitel a promene su jasno vidljive na ultrastrukturnom nivou. NAR je izazvao povećanje visine epitela, broja polimorfni lizozoma i koloidnih kapi u citoplazmi. Sve zajedno, ovo ukazuje na sekretornu aktivniju žlezdu u odnosu na KON grupu. Ovo bi moglo da se objasni stimulacijom TSH, jer se povećanje broja lizozoma javlja neposredno nakon TSH stimulacije (Uchiyama i sar., 1986; Krupp i Lee, 1986). S' druge strane, HES je izazvao blaže promene, tako da je struktura tirocita manje promenjena u odnosu na NAR grupu, ali se ipak uočava razlika u visini folikulskog epitela u poređenju sa KON grupom. Promene na ultrastrukturnom nivou su u skladu sa smanjenom zastupljenošću koloida u štitastoj žlezdi pacova tretiranih citrusnim flavanonima i ukazuje na pojačanu aktivnost žlezde, pogotovo nakon NAR tretmana.

Analiza ekspresije specifičnih proteina štitaste žlezde: TPO, Tg, T_4 -Tg, NIS i VEGF pružila nam je uvid u funkcionalni status štitaste žlezde pacova. Starenje je uticalo na smanjenje ekspresije NIS i T_4 -Tg proteina, dok su ostali paramteri nepromenjeni. NIS kotransporter predstavlja ključan protein u biosintezi TH jer omogućava usvajanje joda iz cirkulacije (Bizhanova i Kopp, 2009). Rezultati drugih autora su u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije, da se sa starenjem smanjuje imunohistohemijska ekspresija NIS i PDS, kao i NOS III. Na ovaj način se indirektno potvrđuje da transport

joda i funkcionalna aktivnost štitaste žlezde opada u našem eksperimentalnom modelu (Faggiano i sar., 2004; Gérard i sar., 2002).

Osim NIS, smanjena je IHH ekspresija T₄-Tg, koji predstavlja T₄ vezan za Tg, te je stoga merilo koncentracije hormona i funkcionalnog statusa štitaste žlezde (Faggiano i sar., 2004, Šošić-Jurjević i sar., 2014). Antitelo za T₄-Tg specifično detektuje novosintetisani T₄ i predstavlja vrlo jasan pokazatelj funkcije žlezde. Štitasta žlezda starih miševa karakteriše se prisustvom nesolubilnih granula Tg u lumenu hipofunkcionalnih folikula (Gérard i sar., 2004), a smanjenje RIF T₄-Tg signala je u skladu sa podacima da štitasta žlezda pacova sa starenjem sintetiše manje TH (Donda i Lemarchand-Beraud, 1989; Cizza i sar., 1992; Moreira i sar., 2005).

IHH karakterizacija štitaste žlezde pacova tretiranih NAR ili HES pokazala je pojačan T₄-Tg signal u luminalnom koloidu folikula, kao i VEGF u folikulskom epitelu u poređenju sa KON grupom. S druge strane, pokazano je da je ekspresija TPO, Tg i NIS proteina u folikulskom epitelu ostala nepromenjena nakon oba tretmana. Međutim, uočava se akumulacija TPO na apikalnoj membrani aktivnih folikula što ukazuje na povećanje sintetske aktivnosti. Dodatno, suptilno povećanje Tg signala nakon tretmana flavanonima je važno, jer se akumuliranje Tg dešava samo u slučajevima kada je kritična količina joda organifikovana (Gerber i sar., 1981).

Pokazano je da NAR inhibira aktivnost TPO *in vitro* (Divi i Doerge, 1996), iako postoje oprečni podaci o ovim efektima *in vivo*. Naime, flavonoid rutin, za koji je takođe potvrđeno da inhibira aktivnost TPO *in vitro*, ali u manjoj meri od NAR (Divi i Doerge, 1996), ima stimulatorni efekat na TPO i na usvajanje joda kada se aplikuje *in vivo* (Lima Gonçalves i sar., 2013). Dodatno, sojini izoflavoni, koji snažno inhibiraju aktivnost TPO kako *in vitro* tako i *in vivo*, nisu uticali na promenu koncentracije TSH i TH u serumu mladih adultnih pacova (Chang i Doerge, 2000).

Pojačana ekspresija VEGF proteina u skladu je sa nalazom pojačane mikrocirkulacije oko aktivnih folikula. Osim toga, TSH stimuliše ekspresiju ovog proteina (Gérard i sar., 2009; Cao, 2014) i u stanju je da poveća površinu krvnih sudova koji okružuju folikul, ali i da utiče na povećanje procesa angiogeneze u slučaju veće potrebe organizma za T₄ ili usled nedostatka joda (Gérard i sar., 2009).

Izraženiji T₄-Tg RIF u štitastoj žlezdi pacova nakon HES tretmana u poređenju s NAR ukazuje na jači inhibitorni efekat NAR na aktivnost TPO i sintezu TH u poređenju sa

KON pacovima. Ipak, dobijeni rezultati u vezi sa povećanom ekspresijom T₄-Tg u štitastoj žlezdi starih pacova ukazuju na povećanje i *de novo* sintezu T₄, te očuvan kapacitet štitaste žlezde da odgovori na promene i spoljašnje stimulse.

Kod SIKON pacova, smanjenje T₄-Tg RIF signala u štitastoj žlezdi u skladu je sa sniženom koncentracijom ukupnog T₄ u serumu u poređenju sa vrednostima ovih parametara dobijenih za MIKON životinje. Sa starenjem, opada koncentracija T₄ u cirkulaciji usled smanjene aktivnosti žlezde, a smanjuje se i broj THS-R na folikulskim ćelijama zbog čega žlezda postaje manje osetljiva na stimulaciju TSH (Armengol i sar., 2001). Koncentracija TSH nije promenjena, što je u skladu sa rezultatima Donda i Lemarchand-Beraud (1989) koji su objavili da njegova koncentracija ostaje nepromenjena ili je blago povišena u ovom starosnom uzrastu.

Nakon tretmana NAR, koncentracija TSH u krvi viša je u odnosu na KON grupu, iako se uočava izvesno (ali ne i statistički značajno) povišenje TSH nakon HES tretmana. Uprkos nepromenjenoj koncentraciji ukupnog T₄ u serumu nakon tretmana oba flavanona, ne možemo isključiti mogućnost smanjene produkcije T₃ u štitastoj žlezdi usled promena aktivnosti enzima DIO 1. Naringin i hesperidin, glikozidi NAR i HES, inhibiraju aktivnost ovog enzima u jetri hipertiroidnih pacova (Panda i Kar, 2014). Iako ekspresija ovog gena u jetri u našem modelu nije promenjena, moguće je da je snižena u štitastoj žlezdi, što je značajno jer ona produkuje 50% T₃ u cirkulaciji. Dalja istraživanja određivanja ekspresije *Dio1* i *2* u štitastoj žlezdi kao i koncentracije T₃ u krvi neophodna su da bi ispitali ovu mogućnost.

Neke studije ukazuju da su povećana sekrecija TSH i normalni TH u serumu, posebno nakon šeste decenije života, povezani sa produžetkom životnog veka (Atzmon i sar., 2009). Takođe, smanjenje aktivnosti GH/IGF-1 osovine povezuje se sa istim fenomenom (Bowers i sar., 2013; Atzmon i sar., 2009). Preterana akumulacija štetnih ROS u hipofizi tokom starenja povećava broj apoptotskih ćelija, posebno onih koje sekretuju TSH i GH (Vitale i sar., 2013). NAR i HES su potentni antioksidanti, koji mogu da preveniraju ovu štetu i poboljšaju osetljivost tirotrpnih ćelija u cilju boljeg odgovora na regulaciju TRH i TH sa starenjem (Boelaert, 2013). Lokalna aktivnost DIO1 i 2, koja je povećana u hipofizi starih pacova (Donda i Lemarchand-Béraud, 1989; Corrêa Da Costa i sar., 2001), mogla bi biti smanjena nakon tretmana

flavanonima, rezultirajući povišenom sekrecijom TSH nakon tretmana NAR u ovim eksperimentalnim uslovima, izazivajući efekte subkliničke hipotiroze.

Radi procene statusa TH, ispitivana je genska ekspresija T_3 regulisanih gena u jetri: *Dio1*, *Thrsp*, *Lxr*, *Fas* i *Fat* nakon tretmana NAR i HES. Njihova ekspresija predstavlja odgovor ciljnog tkiva na stimulaciju TH (Coppola i sar., 2014; Sinha i sar., 2014). NAR je snizio ekspresiju *Thrsp*, *Lxr*, *Fas* i *Fat* gena, dok HES nije inhibirao ekspresiju samo *Fas* gena. Ovo je značajan rezultat, jer iako koncentracija T_4 u serumu nije promenjena nakon tretmana citrusnim flavanonima, ekspresija T_3 regulisanih gena u jetri je značajno snižena (svih sem *Dio1*). Moguća objašnjenja ovog rezultata su snižena sistemska koncentracija T_3 , usled smanjene sekrecije T_3 iz štitaste žlezde, kao i direktan inhibitorski uticaj flavanona na aktivnost DIO 1 enzima u jetri. Dalja istraživanja su neophodna za rasvetljavanje ovog mehanizma.

TH regulišu homeostazu (metabolizam) masnih kiselina i holesterola ispoljavajući tako direktan efekat na lipidni status. Stoga, tiroidna disfunkcija u našem eksperimentalnom modelu može da utiče na intrahepatični, kao i sistemske disbalans u metabolizmu ovih nutrijenata, koji predstavljaju važan izvor energije za ćelije.

NAR i HES, kao i naringin i hesperidin, utiču na smanjenje ekspresije gena *Fas*, *Acc*, *Ma*, *Thrsp* što dovodi do smanjene lipo- i holesterogeneze u jetri (Hashimoto i Ide, 2015; Pu i sar., 2012; Sharma i sar., 2011; Shin i sar., 1999). Imajući u vidu akumulaciju lipida u jetri i povećanje koncentracije u serumu sa starenjem (Kuhla i sar., 2011), ovaj prelazak sa lipogenog na lipolitički put metabolizma lipida smatra se pozitivnim ishodom. Dodatno, smanjenje ekspresije *Fat* se dovodi u vezu sa smanjenim usvajanjem slobodnih masnih kiselina u jetri, jer FAT predstavlja njihov glavni transporter (He i sar., 2011; Wilson i sar., 2016).

U jetri starih životinja dolazi do favorizovanja lipogenog puta metabolizma masti (Kuhla i sar., 2011), što uz pojavu simptoma hipotiroidizma, kao što su hiperlipidemija i usporavanje metabolizma, povećava incidencu za NAFLD (Eshraghian and Hamidian Jahromi, 2014). Međutim, kako citrusni flavanoni utiču na inhibiciju lipogenih gena, ovaj efekat NAR i HES se može smatrati korisnim.

Poznato je da u nedostatku T_3 , TR utiče na represiju transkripcije ciljnih gena, vezujući se samostalno za TRE sekvence u promotorskom regionu (Yen, 2001). Međutim, ova represija ciljnih gena delimično može da bude posledica stimulatornog delovanja

citrusnih flavanona na ekspresiju PPAR α (Goldwasser i sar., 2010; Huong i sar., 2006; Alam i sar., 2014; Cho i sar., 2011; Li i sar., 2015), imajući u vidu da su TR i PPAR u direktnoj kompeticiji za dimerizaciju s RXR (Evans i Mangelsdorf, 2014; Liu i Brent, 2010). Takođe, NAR inhibira LXR i njegov efektorski molekul SREBP-1C, na taj način interferirajući sa metabolizmom masnih kiselina i holesterola (Goldwasser i sar., 2010; Mulvihill i sar., 2009). Imajući u vidu smanjenje eliminacionih procesa u jetri starih životinja (Sinha i sar., 2014; Ulven i sar., 2005; Schultz i sar., 2000; Kalaany i Mangelsdorf, 2006), nezatno povećanje holesterola u serumu nakon tretmana NAR može se objasniti lokalnom hipotireozom u jetri, kao i direktnom interferencijom NAR sa procesom transporta holesterola i njegove smanjene eliminacije putem žuči.

Suncokretovo ulje nije imalo uticaja na ekspresiju ispitivanih gena u KON grupi, sem u slučaju *Fat*. To se dovodi u vezu s povećanom koncentracijom slobodnih masnih kiselina u serumu usled aplikacije suncokretovog ulja. Pokazano je da PUFA imaju inhibitoran efekat na ekspresiju gena uključenih u proces lipogeneze u jetri (Ren i sar., 1997; Kim i sar., 2003; Clarke i sar., 1990). Iako je suncokretovo ulje prirodno bogato PUFA 18:2 n-6 (koja čini 60% udela ovog ulja; Vučić i sar., 2012), da bi značajnije uticala na gensku ekspresiju, zastupljenost PUFA u hrani bi trebalo da bude 10 puta viša nego što je bila u našem eksperimentalnom modelu (Clarke i sar., 1990; Ren i sar., 1997).

Nakon tretmana NAR, uz povišen TSH i nepromenjen T₄ (iako postoji tendencija opadanja njegove koncentracije u serumu), uočava se povišenje HDL, dok ostali parametri lipidnog statusa u serumu nisu promenjeni u poređenju s KON životinjama. Ovo je značajno, jer su pacovi „HDL životinje“, tj. ovaj lipoprotein je glavni transporter HOL u krvi za razliku od ljudi kod kojih LDL ima ovu ulogu (Sanchez-Muniz i Bastida, 2008). Njegovo povećanje ukazuje na blago povišenu koncentraciju HOL u serumu, što je u skladu sa blagom hipotirozom (Sinha i sar., 2014). Kod pacova i ljudi na hiperholesterolskoj ishrani, uočava se povećanje koncentracije ukupnog HOL u serumu. Međutim, kod pacova se smanjuje koncentracija HDL, dok se kod ljudi uočava povećanje koncentracije LDL (Chiang i sar., 1998; Fukushima i sar., 2001). Povećanje koncentracije HDL nakon NAR se može smatrati pozitivnim ishodom, imajući u vidu važnost ovog lipoproteina u transportu HOL u serumu pacova.

Za razliku od NAR, nakon tretmana HES nije detektovana promena lipidnog profila, kao ni TSH u cirkulaciji. Međutim, u drugim studijama i eksperimentalnim modelima pokazano je da HES može imati hipolipidemijski efekat, ali u većim dozama u odnosu na naš eksperimentalni model. Ove doze (raspon od 50 do 500 mg/kg t.m; Akiyama i sar., 2009; Pérez-Vargas i sar., 2014; Bok i sar., 1999) su višestruko veće u odnosu na našu, nutritivno relevantnu dozu (Chanet et al. 2012)..

Hipotiroidizam se smatra faktorom rizika za razvoj NAFLD, a oba poremećaja su povezana sa hiperlipidemijom, gojaznošću i insulinskom rezistencijom (Coppola i sar., 2014). S druge strane, kako se hipotiroidizam takođe dovodi u vezu sa smanjenjem rizika od nastanka oštećenja jetre (Bruck i sar., 1998) ispitali smo strukturu jetre starih mužjaka pacova nakon tretmana NAR ili HES. Osim toga, odredili smo i koncentraciju enzima ALT, AST i GGT u serumu, kako bismo izvršili procenu funkcionalnog statusa jetre.

Nakon tretmana oba citrusna flavanona, nismo uočili smanjenje mase jetre, steatozne promene, inflamaciju, niti smo primetili oštećenja hepatocita. Koncentracija AST i ALT u serumu je čak snižena u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Ovo je važan podatak, jer se smatra da je povećanje koncentracije AST i ALT jedan od najpouzdanijih i najosetljivijih pokazatelja oštećenja jetre (Kim i sar., 2008). Koncentracija GGT nije promenjena, iako se povišen GGT u serumu starih životinja dovodi u vezu sa povećanim korišćenjem unutarćelijskog GSH (Speisky, 1992), što ukazuje na prisustvo oksidativnog stresa (Lee i sar., 2004). Prema literaturnim podacima, tretman flavonoidima utiče na skraćivanje inflamatorne reakcije i infiltraciju imunskih ćelija u parenhim jetre (Xu i sar., 2015; Alam i sar., 2014). Kako je jetra starih pacova manje funkcionalna nego kod mladih, očuvanje njene normalne arhitekture i poboljšanje funkcije nakon tretmana NAR i HES predstavlja pozitivan rezultat ovog istraživanja.

Dostupne masne kiseline ugrađuju se u fosfolipide membrane, tako da od koncentracije određenih masnih kiselina u citoplazmi zavisi njihov udeo u fosfolipidima membrane. Kako su PUFA od posebnog značaja jer su podložne lipidnoj peroksidaciji, određivanje masnokiselinskog profila u fosfolipidima membrane hepatocita predstavlja pouzdan prognostički parametar kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti (Kardum i sar., 2014). U ovoj studiji primećeno je povećanje 18:2 n-6 PUFA u KON u poređenju sa vrednostima dobijenim za SIKON grupu. Ovo je najverovatnije posledica visokog udela

18:2 n-6 u suncokretovom ulju (Grompone, 2011) i povećane ekspresije *Fat* transportera, koji učestvuje u preuzimanju masnih kiselina u jetri (Zhang i sar., 2003). Ipak, nakon četvoronedeljnog tretmana NAR i HES detektovali smo smanjenje odnosa n-6/n-3 PUFA u masnokiselinskom profilu fosfolipida membrane hepatocita starih pacova. Dobijeni rezultati su u rangu rezultata dobijenih u analizi masnokiselinskog profila membrane jetrenih ćelija tromesečnih pacova (Popović i sar., 2012). Ovaj rezultat smatramo korisnim i važnim, jer je smanjivanje sadržaja n-3 PUFA i povećanje n-6/n-3 odnosa u vezi sa nastankom bolesti jetre povezanih sa starenjem (Araya i sar., 2004).

Prisustvo DHA, najzastupljenije n-3 masne kiseline u membrani (22:6n-3) i n-3 PUFA je takođe bila povećana nakon administracije citrusnih flavanona, dok je zastupljenost EPA (20:5n-3) i n-6 PUFA bila snižena. Ipak, imajući u vidu da je DHA prisutna u 30 puta većoj koncentraciji u odnosu na EPA, ovo sniženje ne mora biti od velikog biološkog značaja (Castellini i sar., 2016).

Zastupljenost 18:3n-3 masne kiseline, neophodne za biosintezu EPA i DHA, je bila smanjena u grupi tretiranoj s HES, dok je nakon tretmana NAR ostala nepromenjena. Imajući u vidu da je sinteza DHA povećana a EPA smanjena nakon oba tretmana, moguće je da su citrusni flavanoni delovali na aktivnost i gensku ekspresiju delta 6 i 5 desaturaza, enzima koji učestvuju u desaturaciji PUFA uklanjanjem dva vodonikova atoma i stvaranjem dvostruke veze. Vauzour i saradnici (2015) su pokazali da suplementacija antocijanom definidin-3-glukozidom smanjuje količinu EPA za 60% i relativnu koncentraciju iRNK delta 6 desaturaze. Uticaj citrusnih flavanona na aktivnost i ekspresiju ovih enzima zahteva dalja istraživanja.

Takođe, primetili smo promenu odnosa arahidonske : adrenične kiseline ka adreničnoj nakon tretmana polifenolima. Ovo je od velike važnosti jer prostaglandini i leukotrijeni poreklom od arahidonske kiseline izazivaju inflamatornu reakciju (Kohli i Levy, 2009). S druge strane, DHA je prekursor rezolvina, protektina i marezina, medijatora uključenih u završetak inflamatorne reakcije koji smanjuju inflamaciju i izazivaju eferocitozu ćelija u nekrozi ili apoptozi putem aktivacije makrofaga (Serhan, 2008). Imajući u vidu produženje trajanja inflamatorne reakcije sa starenjem (Arnardottir i sar., 2014; Recchiuti, 2014) ova promena u zastupljenosti DHA bi mogla da bude dodatni koristan efekat NAR i HES, koji iziskuje dalja ispitivanja.

U okviru fosfolipidne membrane povišen je sadržaj MUFA, ali samo nakon NAR tretmana, dok je SFA povećan samo nakon HES tretmana. Povećanje sadržaja MUFA, odnosno SFA u fosfolipidima i desaturacija membrane u jetri i srcu pozitivno korelira sa produženjem životnog veka kod različitih životinjskih vrsta (Anantharaju i sar., 2002; Hulbert i sar., 2007).

Nakon tretmana HES nije promenjena genska ekspresija *Fas*. Ovaj rezultat je u skladu sa povećanjem zastupljenosti palmitinske C16:0 zasićene masne kiseline i posledično povećanja udela SFA u membranama hepatocita. Poznato je da HES inhibira mikrozomalnu SCD-1 (Nichols i sar., 2011), ključan enzim koji katalizuje desaturaciju SFA u MUFA. SCD-1 uvodi dvostruku vezu u palmitinsku i sterinsku masnu kiselinu (Ntambi, 1995). Time se objašnjava zašto je nakon NAR došlo do povećanja MUFA, a nakon HES ne, jer je povećanje SFA signal za njihovo prevođenje u mononezasićene masne kiseline (Ntambi, 1995).

THRSP predstavlja molekularni senzor delovanja T_3 , a s obzirom na inhibiciju njegove ekspresije govorimo o hipotiroidnom stanju izazvanog citrusnim flavanonima kod starih životinja. Hipotiroidizam i starenje se dovode u vezu sa povećanjem oksidativnog stresa i opadanjem antioksidativne zaštite (Petrulea i sar., 2012; Rahman, 2007).

NAR i HES poseduju antioksidativne osobine pa je deo ove doktorske disertacije posvećen ispitivanju antioksidativnog potencijala i njihovog uticaja na proces lipidne peroksidacije membrane u našem modelu prirodno ostarelih pacova.

NAR i HES su statistički značajno snizili koncentraciju TBARS u jetri starih pacova. Određivanje koncentracije TBARS je indikator stepena oštećenja lipidne membrane. S tim u vezi, ovaj rezultat se smatra posebno pozitivnim, imajući u vidu da su proizvodi oštećenja lipida i proteina povećani kod ćelija koje stare (Cui i sar., 2012; Ziegler i sar., 2015). Prirodni antioksidanti iz soka grejpfruta ili pomorandže mogu da neutrališu ROS jer poseduju sposobnost da deluju kao skavandžeri slobodnih radikala (Cavia-Saiz i sar., 2010). Naime, ovi aglikoni imaju hidroksilne grupe na 5- i 7- C atomu što ih čini odličnim kandidatima za eliminisanje superoksida, kao i blokatorima formiranja TBARS.

Smanjenje lipidne peroksidacije se dovodi u vezu sa smanjenjem incidence metaboličkih disbalansa kao i kardiovaskularnih bolesti (Oteiza i sar., 2005; Assini i sar., 2013; Mulvihill i sar., 2009). n-3 i n-6 PUFA su veoma podložne peroksidaciji koja

za rezultat ima stvaranje velike količine ROS (Gladine i sar., 2014; Hulbert i sar., 2007). Kao lipofilni molekuli, polifenoli prirodnog porekla mogu da se inkorporiraju u lipidne membrane i da efikasno sakupljaju slobodne radikale ili da izmene fluidnost same membrane i na taj način da zaustave dalje širenje oksidativnog oštećenja (Oteiza i sar., 2005).

U poređenju sa mladim intaktnim kontrolama, 24-mesečni intaktni pacovi su imali nižu aktivnost SOD1, CAT i GR enzima što ukazuje na smanjenu sposobnost jetri starih životinja da eliminišu štetne reaktivne vrste (neprikazani podaci). Dodatno, suncokretovo ulje je snizilo relativnu gensku ekspresiju CAT u poređenju sa vrednostima dobijenim za SIKON grupu. Na gensku ekspresiju antioksidativnih enzima mogu da utiču nutritivni faktori i za različita ulja koja se koriste u ishrani je pokazano da utiču na aktivnost ovih enzima (Ruiz-Gutiérrez i sar., 1999).

Tretman NAR je povećao aktivnost GPx i GR što je u skladu sa povećanom genskom i proteinskom ekspresijom ovih enzima. S druge strane, genska i proteinska ekspresija CAT je bila povećana iako aktivnost ovog enzima nije značajno izmenjena. U normalnim uslovima, delovanjem CAT i GPx se štetni H₂O₂ transformiše u bezopasne proizvode. Promene u enzimskoj aktivnosti CAT i GPx mogu da budu glavni faktor koji doprinosi razvoju fenotipa karakterističnog za stare ćelije (Sullivan-Gunn i Lewandowski, 2013). Osim toga, glikacija CAT smanjuje aktivnost ovog enzima i značajno remeti antioksidativnu ravnotežu kod starih pacova (Bakala i sar., 2012).

U grupi tretiranoj NAR povećana je enzimska aktivnost SOD1 i SOD2 u jetri. Ipak, genska ekspresija SOD1 i SOD2 nije promenjena, dok je slučaju SOD2 proteinska ekspresija povećana. NAR, ali ne HES ispoljava prooksidativne osobine. NAR formira flavanoid radikal (Constantin i sar., 2013) koji direktno utiče na uočeno povećanje u aktivnosti enzima SOD. Najvažniji parametar u evaluaciji uticaja neke supstance na AOE je aktivnost enzima, dok genska i proteinska ekspresija enzima ne moraju da budu u skladu sa njegovom aktivnošću (Weydert i Cullen, 2010). Moguće je da flavanoni svojim osobinama stvaraju takvu mikrosredinu koja je od ključne važnosti za povećanje aktivnosti AOE i to tako što utiču na difuziju supstrata ka aktivnom centru enzima. Polifenol iz zelenog čaja, EGCG (epigalokatehin-3-galat) takođe stvara ROS, ali se većina njegovih prooksidativnih aktivnosti blokira u prisustvu SOD i CAT (Li i sar., 2010).

Uzimajući u obzir svojstvo NAR da deluje kao prooksidans, rezultati nedvosmisleno ukazuju da je NAR tretman poboljšao antioksidativnu zaštitu u jetri starih mužjaka. NAR, ali ne i HES, izazivajući blag/umeren oksidativni stres, tzv. pozitivni oksidativni stres, može da zaštiti organizam od letalnih promena koje bi u suprotnom izazvale ćelijsku smrt i oštećenje tkiva (koncept hormezisa; Yan, 2014).

HES je imao blaži efekat na AOE u poređenju sa NAR. On je izazvao povećanje aktivnosti CAT i GR, genske ekspresije *Cat*, dok je proteinska ekspresija GPx i SOD2 smanjena. Na taj način, na osnovu poređenja dobijenih rezultata o uticaju NAR i HES, izgleda da su antioksidativna svojstva HES posledica njegovih sposobnosti u stimulanju eliminacije ROS, ali ne i ispoljavanja prooksidativnih osobina, kao što je to slučaj s NAR.

Redoks ravnoteža se poboljšala samo nakon tretmana NAR. Ova promena je u skladu sa povećanjem aktivnosti AOE gde je suplementacija NAR povećala GSH/GSSG odnos, kao i koncentraciju ukupnih tiolnih grupa u jetri starih mužjaka. Ovo povećanje je značajno imajući u vidu prooksidativnu prirodu NAR, ali i povećanje oksidativnog oštećenja koje se javlja kod starih (Bakala, 2012; Barja, 2002). Relativno niske koncentracije flavonoida su potrebne kako bi se stimulisala ekspresija ključnih gena za sintezu GSH (Myhrstad i sar., 2002). Uočene promene svakako doprinose boljoj zaštiti od unutarćelijskog H_2O_2 i detoksikaciji elektrofilnih supstanci (Townsend i sar., 2003). NAR i HES su ispoljili pozitivan efekat koji se ogledao u poboljšanju antioksidativne odbrane i smanjenju koncentracije nusproizvoda lipidne peroksidacije fosfolipida membrane u jetri starih pacova.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu predstavljenih rezultata, a u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- u starih pacova štitastu žlezdu karakterišu benigne promene, ultimobranhijalne i folikulske ciste i hiperplazija C ćelija u intersticijumu žlezde, niskoprizmatični folikulski epitel, smanjenje sintetske aktivnosti žlezde, volumenske gustine NIS-imunopozitivnog epitela, vrednosti RIF T₄-Tg u koloidu, kao i koncentracije T₄ u serumu, u poređenju sa vrednostima dobijenim za mlade mužjake;
- tretman starih mužjaka pacova citrusnim flavanonima, naringeninom i hesperetinom:
 - menja ultrastrukturne karakteristike ćelija folikulskog epitela; smanjuje relativni volumen koloida i povećava relativni volumen intersticijuma (mikrofolikulska struktura štitaste žlezde);
 - dovodi do akumulacije TPO u apikalnom delu membrane folikula i tirocita, povećanja RIF T₄-Tg u koloidu, kao i povećanja ekspresije VEGF u tirocitima i intersticijumu tkiva štitaste žlezde;
 - dovodi do smanjenja koncentracije enzima ALT i AST u serumu, smanjenja relativne koncentracije iRNK *Thrsp*, *Lxr*, *Fat* gena u jetri, a ekspresija *Fas* gena je snižena samo nakon tretmana naringeninom;
 - utiče na povećanje zastupljenosti n-3, a smanjenja prisustva n-6 masnih kiselina u fosfolipidima hepatocita;
 - dovodi do snižavanja stepena lipidne peroksidacije membrane hepatocita;
- povećanje koncentracije TSH i HDL u serumu starih životinja, kao i sekretorne aktivnosti u tirocitima uočava se samo nakon tretmana naringeninom;
- naringenin povećava aktivnost SOD1, SOD2, GPx i GR, gensku ekspresiju *Cat*, *Gpx* i *Gr* i proteinsku ekspresiju SOD2, CAT, GPx i GR enzima, ukupni i redukovani GSH, GSH/GSSG odnos i koncentraciju SH-grupa GSH u jetri starih pacova;
- hesperetin povećava aktivnost CAT i GR enzima, gensku ekspresiju *Cat* i smanjuje proteinsku ekspresiju SOD2 i GPx enzima.

Opšti zaključak

Iz navedenih pojedinačnih zaključaka može se izvesti opšti zaključak da sa starenjem dolazi do kvalitativnih i funkcionalnih promena koje se ogledaju u slabijoj sekretornoj i sintetskoj aktivnosti štitaste žlezde i snižavanju koncentracije T_4 u serumu, u odnosu na mlade životinje. Primena citrusnih flavanona, naringenina i hesperetina, izaziva simptome subkliničke hipotiroze koji se zapažaju na dva nivoa, centralno na nivou hipozife i sekrecije TSH, a periferno supresijom ekspresije T_3 regulisanih gena, menjajući tako tiroidnu homeostazu starih mužjaka pacova. Naringenin je izazvao značajnije promene većine ispitivanih parametara u poređenju sa hesperetinom.

Ipak, pored neželjenih efekata koje ispoljavaju na nivou hipozifno-tiroidnog sistema, citrusni flavanoni imaju pozitivne efekte na jetru starih pacova. Njihovom upotrebom dolazi do desaturacije masnih kiselina u fosfolipidima membrane i povećanja udela n-3 masnih kiselina, kao i poboljšanja sistema antioksidativne zaštite u jetri starih pacova. Sistemsko poboljšanje antioksidativne zaštite potencijalno dovodi do smanjenja autoantigenosti i razvoja tiroidnih i ostalih bolesti povezanih sa starenjem. Ove promene, uz povišen nivo TSH u serumu, mogu da se dovodu u vezu sa produženjem životnog veka pacova i ljudi. Dalja istraživanja će omogućiti rasvetljavanje mehanizama delovanja i optimizaciju upotrebe naringenina i hesperetina kao suplemenata koji mogu da pomognu u procesu zdravog starenja.

7.LITERATURA

- Adams, A.C., Astapova, I., Fisher, F.M., Badman, M.K., Kurgansky, K.E., Flier, J.S., Hollenberg, A.N., and Maratos-Flier, E. (2010). Thyroid hormone regulates hepatic expression of fibroblast growth factor 21 in a PPAR α -dependent manner. *J. Biol. Chem.* *285*, 14078–14082.
- Akiyama, S., Katsumata, S., Suzuki, K., Nakaya, Y., Ishimi, Y., and Uehara, M. (2009). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of hesperidin and cyclodextrin-clathrated hesperetin in goto-kakizaki rats with type 2 diabetes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *73*, 2779–2782.
- Alam, M.A., Subhan, N., Rahman, M.M., Uddin, S.J., Reza, H.M., and Sarker, S.D. (2014). Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* *5*, 404–417.
- Ameziane-El-Hassani, R., Schlumberger, M., and Dupuy, C. (2016). NADPH oxidases: new actors in thyroid cancer? *Nat. Rev. Endocrinol.* *12*, 485–494.
- Anantharaju, A., Feller, A., and Chedid, A. (2002). Aging liver: A review. *Gerontology* *48*, 343–353.
- Andersson, M.L., Nordström, K., Demczuk, S., Harbers, M., and Vennström, B. (1992). Thyroid hormone alters the DNA binding properties of chicken thyroid hormone receptors α and β . *Nucleic Acids Res.* *20*, 4803–4810.
- Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L.A., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P., and Poniachik, J. (2004). Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci. (Lond).* *106*, 635–643.
- Armengol, M.P., Juan, M., Lucas-Martín, A., Fernández-Figueras, M.T., Jaraquemada, D., Gallart, T., and Pujol-Borrell, R. (2001). Thyroid autoimmune disease. *Am. J. Pathol.* *159*, 861–873.
- Arnardottir, H.H., Dalli, J., Colas, R. a., Shinohara, M., and Serhan, C.N. (2014). Aging delays resolution of acute inflammation in mice: Reprogramming the host response with novel nano-proresolving medicines. *J. Immunol.* *193*, 4235–4244.
- Assini, J.M., Mulvihill, E.E., Sutherland, B.G., Telford, D.E., Sawyez, C.G., Felder, S.L., Chhoker, S., Edwards, J.Y., Gros, R., and Huff, M.W. (2013). Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-} mice. *J. Lipid Res.* *54*, 711–724.
- Assini, J.M., Mulvihill, E.E., Burke, A.C., Sutherland, B.G., Telford, D.E., Chhoker, S.S., Sawyez, C.G., Drangova, M., Adams, A.C., Kharitonov, A., et al. (2015). Naringenin prevents obesity, hepatic steatosis, and glucose intolerance in male mice independent of fibroblast growth factor 21. *Endocrinology* *156*, 2087–2102.
- Atzmon, G., Barzilai, N., Hollowell, J.G., Surks, M.I., and Gabriely, I. (2009). Extreme longevity is associated with increased serum thyrotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 1251–1254.
- Avior, Y., Bomze, D., Ramon, O., and Nahmias, Y. (2013). Flavonoids as dietary regulators of nuclear receptor activity. *Food Funct.* *4*, 831.
- Babu, E., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Iribe, Y., Tangtrongsup, S., Jutabha, P., Li, Y., Ahmed, N., Sakamoto, S., et al. (2003). Identification of a novel system I

- amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* 278, 43838–43845.
- Bakala, H., Hamelin, M., Mary, J., Borot-Laloi, C., and Friguet, B. (2012). Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822, 1527–1534.
- Baqui, M., Botero, D., Gereben, B., Curcio, C., Harney, J.W., Salvatore, D., Sorimachi, K., Larsen, P.R., and 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, 1206–1211.
- Barja, G. (2002). Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1167–1172.
- Barriere, H., Chambard, M., Muranyi-Kovacs, I., Mauchamp, J., Louvard, D., and Gabrion, J. (1986). Pseudopod membrane in TSH-stimulated thyroid cells: a specialized domain in the neighboring apical plasma membrane. *Cell Tissue Res.* 245, 159–170.
- Beckett, G.J., Russell, A., Nicol, F., Sahu, P., Wolft, C.R., and Arthur, J.R. (1992). Effect of selenium deficiency on hepatic type I 5-iodothyronine deiodinase activity and hepatic thyroid hormone levels in the rat. *Biochem. J* 282, 483–486.
- Bełtowski, J. (2008). Liver X receptors (LXR) as therapeutic targets in dyslipidemia. *Cardiovasc. Ther.* 26, 297–316.
- Benvenega, S., and Robbins, J. (1993). Lipoprotein-thyroid hormone interactions. *Trends Endocrinol. Metab.* 4, 194–198.
- Benvenega, S., and Robbins, J. (1998). Thyroid hormone efflux from monolayer cultures of human fibroblasts and hepatocytes. effect of lipoproteins and other thyroxine transport proteins. *Endocrinology* 139, 4311–4318.
- Berghout, A., Wiersinga, W.M., Smits, N.J., and Touber, J.L. (1990). Interrelationships between age, thyroid volume, thyroid nodularity, and thyroid function in patients with sporadic nontoxic goiter. *Am. J. Med.* 89, 602–608.
- Bernal, J., Guadaño-Ferraz, A., and Morte, B. (2015). Thyroid hormone transporters—functions and clinical implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 406–417.
- Bernier-Valentin, F., Kostrouch, Z., Rabilloud, R., Munari-Silem, Y., and Rousset, B. (1990). Coated vesicles from thyroid cells carry iodinated thyroglobulin molecules. First indication for an internalization of the thyroid prohormone via a mechanism of receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 265, 17373–17380.
- Berson, S.A., and Yalow, R.S. (1955). The iodide trapping and binding functions of the thyroid. *J. Clin. Invest.* 34, 186–204.
- Bianco, A.C., and Kim, B.W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* 116, 2571–2579.
- Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., and Larsen, P.R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23, 38–89.
- Bianco, A.C., Anderson, G., Forrest, D., Galton, V.A., Gereben, B., Kim, B.W., Kopp, P.A., Liao, X.H., Obregon, M.J., Peeters, R.P., et al. (2014). American thyroid

association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. *Thyroid* 24, 88–168.

Bisschop, P.H., Toorians, A.W., Endert, E., Wiersinga, W.M., Gooren, L.J., and Fliers, E. (2006). The effects of sex-steroid administration on the pituitary-thyroid axis in transsexuals. *Eur. J. Endocrinol.* 155, 11–16.

Bizhanova, A., and Kopp, P. (2009). The sodium-iodide symporter and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology* 150, 1084–1090.

Bobyk, K.D., Ballou, D.P., and Rokita, S.E. (2015). Rapid kinetics of dehalogenation promoted by iodotyrosine deiodinase from human thyroid. *Biochemistry* 54, 4487–4494.

Bodoy, S., Martín, L., Zorzano, A., Palacín, M., Estévez, R., and Bertran, J. (2005). Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. *J. Biol. Chem.* 280, 12002–12011.

Boelaert, K. (2013). Thyroid dysfunction in the elderly. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 194–204.

Bok, S.H., Lee, S.H., Park, Y.B., Bae, K.H., Son, K.H., Jeong, T.S., and Choi, M.S. (1999). Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr.* 129, 1182–1185.

Borges, P.P., Curty, F.H., Pazos-Moura, C.C., and Moura, E.G. (1998). Effect of testosterone propionate treatment on thyrotropin secretion of young and old rats in vitro. *Life Sci.* 62, 2035–2043.

Borradaile, N.M., de Dreu, L.E., Barrett, P.H.R., and Huff, M.W. (2002). Inhibition of hepatocyte apoB secretion by naringenin: enhanced rapid intracellular degradation independent of reduced microsomal cholesteryl esters. *J. Lipid Res.* 43, 1544–1554.

Bousquet, J., Joao, M., Michel, N., Rodriguez, L., Md, M., Vellas, B., and Farrell Ba, J. (2015). Operational definition of active and healthy aging (aha): the european innovation partnership (EIP) on AHA reference site questionnaire: Montpellier October 20–21, 2014, Lisbon July 2, 2015. *JMDA* 16, 1020–1026.

Bowers, J., Terrien, J., Clerget-Froidevaux, M.S., Gothie, J.D., Rozing, M.P., Westendorp, R.G.J., Van Heemst, D., and Demeneix, B.A. (2013). Thyroid hormone signaling and homeostasis during aging. *Endocr. Rev.* 34, 556–589.

Braun, D., and Schweizer, U. (2015). Efficient activation of pathogenic Δ Phe501 mutation in monocarboxylate transporter 8 by chemical and pharmacological chaperones. *Endocrinology* 156, 4720–4730.

Braverman, L.W., Dawber, N.A., and Ingbar, S.H. (1966). Observations concerning the binding of thyroid hormones in sera of normal subjects of varying ages. *J. Clin. Invest.* 45, 1273–1279.

Brown, S.B., Maloney, M., and Kinlaw, W.B. (1997). Spot 14; protein functions at the pretranslational level in the regulation of hepatic metabolism by thyroid hormone and glucose. *J. Biol. Chem.* 272, 2163–2166.

- Bruck, R., Oren, R., Shirin, H., Aeed, H., Papa, M., Matas, Z., Zaidel, L., Avni, Y., and Halpern, Z. (1998). Hypothyroidism minimizes liver damage and improves survival in rats with thioacetamide induced fulminant hepatic failure. *Hepatology* 27, 1013–1020.
- Cai, Y.-Z., Mei Sun, Jie Xing, Luo, Q., and Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 78, 2872–2888.
- Campbell, M.C., Anderson, G.W., and Mariash, C.N. (2003). Human spot 14 glucose and thyroid hormone response: characterization and thyroid hormone response element identification. *Endocrinology* 144, 5242–5248.
- Cao, Y. (2014). VEGF-targeted cancer therapeutics? Paradoxical effects in endocrine organs. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 530–539.
- Capen, C.C. (1997). Mechanistic data and risk assessment of selected toxic end points of the thyroid gland. *Toxicol. Pathol.* 25, 39–48.
- Castellini, C., Dal Bosco, A., Mattioli, S., Davidescu, M., Corazzi, L., Macchioni, L., Rimoldi, S., and Terova, G. (2016). Activity, expression, and substrate preference of the $\Delta 6$ -desaturase in slow- or fast-growing rabbit genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 64, 792–800.
- Catalá, A. (2012). Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “fluid Mosaic Model” to the “lipid Whisker Model.” *Biochimie* 94, 101–109.
- Cavia-Saiz, M., Busto, M.D., Pilar-Izquierdo, M.C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., and Muñiz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1238–1244.
- Chahal, H., and Drake, W. (2007). The endocrine system and ageing. *J. Pathol.* 211, 173–180.
- Chance, B., and Oshino, N. (1971). Kinetics and mechanisms of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction. *Biochem. J.* 122, 225–233.
- Chandra, A.K., De, N., and Shyamosree Roy Choudhury, S.R. (2011). Effect of different doses of un-fractionated green and black tea extracts on thyroid physiology. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 884–896.
- Chanet, A., Milenkovic, D., Manach, C., Mazur, A., and Morand, C. (2012). Citrus flavanones: What is their role in cardiovascular protection? *J. Agric. Food Chem.* 60, 8809–8822.
- Chang, H.-C., and Guarente, L. (2014). SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 138–145.
- Chang, H.C., and Doerge, D.R. (2000). Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 244–252.
- Chao, C., Youssef, J., Rezaiekhalegh, M., Birnbaum, L.S., and Badr, M. (2002). Senescence-associated decline in hepatic peroxisomal enzyme activities corresponds with diminished levels of retinoid X receptor alpha, but not peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1469–1476.

- Chiang, M.T., Chen, Y.C., and Huang, A.L. (1998). Plasma lipoprotein cholesterol levels in rats fed a diet enriched in cholesterol and cholic acid. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* *68*, 328–334.
- Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J., and van Deursen, J.M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Med.* *21*, 1424–1435.
- Cho, K.W., Kim, Y.O., Andrade, J.E., Burgess, J.R., and Kim, Y.-C. (2011). Dietary naringenin increases hepatic peroxisome proliferators-activated receptor α protein expression and decreases plasma triglyceride and adiposity in rats. *Eur. J. Nutr.* *50*, 81–88.
- Christopherson, S.W., and Glass, R.L. (1969). Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *J. Dairy Sci.* *52*, 1289–1290.
- Chtourou, Y., Fetoui, H., Jemai, R., Ben Slima, A., Makni, M., and Gdoura, R. (2015). Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor κ B pathway. *Eur. J. Pharmacol.* *746*, 96–105.
- Chung, H.R. (2014). Iodine and thyroid function. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* *19*, 8–12.
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A., Hershko, A., Messing, A., Lechan, R.M., Gereben, B., and Bianco, A.C. (2015). Differences in hypothalamic type 2 deiodinase ubiquitination explain localized sensitivity to thyroxine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *77*, 1365–1368.
- Cizza, G., Brady, L.S., Calogero, A.E., Bagdy, G., Lynn, A.B., Kling, M.A., Blackman, M.R., Chrousos, G.P., and Gold, P.W. (1992). Central hypothyroidism is associated with advanced age in male Fischer 344/N rats: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* *131*, 2672–2680.
- Claiborne, A. (1984). Catalase activity. *Handbook of methods for oxygen radical research* (Boca Raton : CRC Press Inc).
- Clarke, S.D., Armstrong, M.K., and Jump, D.B. (1990). Dietary polyunsaturated fats uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA content. *J. Nutr.* *120*, 225–231.
- Clarke, S.D., Turini, M., Jump, D.B., Abraham, S., and Reedy, M. (1998). Polyunsaturated fatty acid inhibition of fatty acid synthase transcription is independent of PPAR activation. *Z. Ernährungswiss.* *37 Suppl 1*, 14–20.
- Cody, V., Koehle, J., Auf'mkolk, M., and Hesch, R.D. (1986). Structure-activity relationships of flavonoid deiodinase inhibitors and enzyme active-site models. *Prog. Clin. Biol. Res.* *213*, 373–382.
- Colin, I., and Gérard, A.-C. (2010). The thyroid angiofollicular units, a biological model of functional and morphological integration. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* *165*, 218–28-30.
- Colin, I.M., Deneff, J.-F., Lengelé, B., Many, M.-C., and Gérard, A.-C. (2013a). Recent insights into the cell biology of thyroid angiofollicular units. *Endocr. Rev.* *34*, 209–238.

- Colin, I.M., Deneff, J.-F., Lengelé, B., Many, M.-C., and Gérard, A.-C. (2013b). Recent insights into the cell biology of thyroid angiofollicular units. *Endocr. Rev.* *34*, 209–238.
- Colnot, S., and Perret, C. (2011). Liver zonation. in *molecular pathology of liver diseases*, S.P.S. Monga, ed. (Springer US), pp. 7–16.
- Colquhoun, D.M., Hicks, B.J., and Reed, A.W. (1996). Phenolic content of olive oil is reduced in extraction and refining. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* *5*, 105–107.
- Constantin, R.P., Nascimento, G.S. Do, Constantin, R.P., Salgueiro, C.L., Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E.L., Yamamoto, N.S., and Constantin, J. (2013). Citrus flavanones affect hepatic fatty acid oxidation in rats by acting as prooxidant agents. *Biomed Res. Int.* *2013*.
- Coppola, M., Glinni, D., Moreno, M., Cioffi, F., Silvestri, E., and Goglia, F. (2014). Thyroid hormone analogues and derivatives: Actions in fatty liver. *World J. Hepatol.* *6*, 114–129.
- Correa da Costa, V.M., and Rosenthal, D. (1996). Effect of aging on thyroidal and pituitary T₄-5'-deiodinase activity in female rats. *Life Sci.* *59*, 1515–1520.
- Corrêa Da Costa, V.M., Moreira, D.G., and Rosenthal, D. (2001). Thyroid function and aging: gender-related differences. *J. Endocrinol.* *171*, 193–198.
- Di Cosmo, C., Liao, X.-H., Dumitrescu, A.M., Philp, N.J., Weiss, R.E., and Refetoff, S. (2010). Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *J. Clin. Invest.* *120*, 3377–3388.
- da Costa, C.V.M., and Rosenthal, D. (2013). Aging and subclinical thyroid dysfunction. in *hot topics in endocrine and endocrine-related diseases*, (InTech), DOI: 10.5772/55194.
- Courtin, F., Zrouri, H., Lamirand, A., Li, W.W., Mercier, G., Schumacher, M., Goascogne, C. Le, and Pierre, M. (2005). Thyroid hormone deiodinases in the central and peripheral nervous system. *Thyroid* *15*, 931–942.
- Le Couteur, D.G., Warren, A., Cogger, V.C., Smedsrød, B., Sørensen, K.K., De Cabo, R., Fraser, R., and Mccuskey, R.S. (2008). Old age and the hepatic sinusoid. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* *291*, 672–683.
- Cui, H., Kong, Y., and Zhang, H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J. Signal Transduct.* *2012*, 1–13.
- Cunningham, B.A., Moncur, J.T., Huntington, J.T., and Kinlaw, W.B. (1998). Spot 14 protein: A metabolic integrator in normal and neoplastic cells. *Thyroid* *8*, 815–825.
- Cynamon, H.A., Isenberg, J.N., and Nguyen, C.H. (1985). Erythrocyte malondialdehyde release in vitro: a functional measure of vitamin E status. *Clin. Chim. Acta.* *151*, 169–176.
- Danzi, S., and Klein, I. (2002). Thyroid hormone-regulated cardiac gene expression and cardiovascular disease. *Thyroid* *12*, 467–472.
- Degroot, L.J. (1966). Kinetic analysis of iodine metabolism¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *26*, 149–173.
- De Deken, X., Wang, D., Many, M.-C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J.E., and Miot, F. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* *275*, 23227–23233.

- Dentice, M., and Salvatore, D. (2011). Local impact of thyroid hormone inactivation. *J. Endocrinol.* *209*, 273–282.
- Dentice, M., Marsili, A., Zavacki, A., Larsen, P.R., and Salvatore, D. (2013). The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* *1830*, 3937–3945.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., and Gore, A.C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.* *30*, 293–342.
- Ding, J., and Kopchick, J.J. (2011). Plasma biomarkers of mouse aging. *Age (Omaha)*. *33*, 291–307.
- Divi, R.L., and Doerge, D.R. (1996). Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* *9*, 16–23.
- Divi, R.L., Chang, H.C., and Doerge, D.R. (1997). Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochem. Pharmacol.* *54*, 1087–1096.
- Dohán, O., De la Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, C.S., and Carrasco, N. (2003). The sodium/iodide symporter (NIS): Characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* *24*, 48–77.
- Donda, A., and Lemarchand-Beraud, T. (1989). Aging alters the activity of 5'-deiodinase in the adenohypophysis, thyroid gland, and liver of the male rat*. *Endocrinology* *124*, 1305–1309.
- Doré, S. (2005). Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: More than direct antioxidant actions; Gene/protein regulatory activity. *Neurosignals* *14*, 61–70.
- Dunn, J., and Dunn, A. (2000). Thyroglobulin: chemistry, biosynthesis, and proteolysis. *Werner & Ingbar's The*.
- Dunn, J.T., and Dunn, A.D. (2001). Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid* *11*, 407–414.
- Dunn, A.D., Crutchfield, H.E., and Dunn, J.T. (1991). Proteolytic processing of thyroglobulin by extracts of thyroid lysosomes*. *Endocrinology* *128*, 3073–3080.
- Dunn, A.D., Myers, H.E., and Dunn, J.T. (1996). The combined action of two thyroidal proteases releases T4 from the dominant hormone-forming site of thyroglobulin. *Endocrinology* *137*, 3279–3285.
- Dunn, J.T., Kim, P.S., Dunn, A.D., Heppner, D.G., and Moore, R.C. (1983). The role of iodination in the formation of hormone-rich peptides from thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* *258*, 9093–9099.
- Duthoit, C., Estienne, V., Delom, F., Durand-Gorde, J.-M., Mallet, B., Carayon, P., and Ruf, J. (2000). Production of immunoreactive thyroglobulin c-terminal fragments during thyroid hormone synthesis. *Endocrinology* *141*, 2518–2525.
- Duthoit, C., Estienne, V., Giraud, A., Durand-Gorde, J.-M., Rasmussen, Å.K., Feldt-Rasmussen, U., Carayon, P., and Ruf, J. (2001). Hydrogen peroxide-induced production of a 40 kDa immunoreactive thyroglobulin fragment in human thyroid cells: the onset of thyroid autoimmunity? *Biochem. J.* *360*, 557–562.

- Einstein, F.H., Huffman, D.M., Fishman, S., Jerschow, E., Heo, H.J., Atzmon, G., Schechter, C., Barzilai, N., and Muzumdar, R.H. (2010). Aging *per se* increases the susceptibility to free fatty acid-induced insulin resistance. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *65*, 800–808.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* *82*, 70–77.
- Engels, K., Rakov, H., Zwanziger, D., Moeller, L.C., Homuth, G., Köhrle, J., Brix, K., and Führer, D. (2015). Differences in mouse hepatic thyroid hormone transporter expression with age and hyperthyroidism. *Eur. Thyroid J.* *4*, 81–86.
- Erdamar, H., Cimen, B., Gülcemal, H., Saraymen, R., Yerer, B., and Demirci, H. (2010). Increased lipid peroxidation and impaired enzymatic antioxidant defense mechanism in thyroid tissue with multinodular goiter and papillary carcinoma. *Clin. Biochem.* *43*, 650–654.
- Ericson, L.E., and Nilsson, M. (1992). Structural and functional aspects of the thyroid follicular epithelium. *Toxicol. Lett.* *64–65 Spec No*, 365–373.
- Ericsson, S., Eriksson, M., Vitols, S., Einarsson, K., Berglund, L., and Angelin, B. (1991). Influence of age on the metabolism of plasma low density lipoproteins in healthy males. *Lipoprotein Metab. Age* *87*, 591–596.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.* *24*, 851–874.
- Eshraghian, A., and Hamidian Jahromi, A. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and thyroid dysfunction: a systematic review. *World J. Gastroenterol.* *20*, 8102–8109.
- Esposito, L., Raber, J., Kekonius, L., Yan, F., Yu, G.-Q., Bien-ly, N., Puoliväli, J., Scearce-levie, K., Masliah, E., Mucke, L., et al. (2006). reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer’s disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice. *26*, 5167–5179.
- Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2014). Nuclear receptors, RXR, and the big bang. *Cell* *157*, 255–266.
- Faggiano, A., Coulot, J., Bellon, N., Talbot, M., Caillou, B., Ricard, M., Bidart, J.-M., and Schlumberger, M. (2004). Age-dependent variation of follicular size and expression of iodine transporters in human thyroid tissue. *J. Nucl. Med.* *45*, 232–237.
- Fayadat, L., Niccoli-Sire, P., Lanet, J., and Franc, J.L. (1998). Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking. *Endocrinology* *139*, 4277–4285.
- Felgines, C., Texier, O., Morand, C., Manach, C., Scalbert, a, Régerat, F., and Rémésy, C. (2000). Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *279*, G1148–G1154.
- Ferreira, A.C., Rosenthal, D., and Carvalho, D.P. (2000). Thyroid peroxidase inhibition by *Kalanchoe brasiliensis* aqueous extract. *Food Chem. Toxicol.* *38*, 417–421.
- Field, P.A., and Gibbons, G.F. (2000). Decreased hepatic expression of the low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein in aging rats is associated with delayed clearance of chylomicrons from the circulation. *Metabolism.* *49*, 492–498.

- Finotti, E., and Di Majo, D. (2003). Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Nahrung - Food* 47, 186–187.
- Flamant, F., and Gauthier, K. (2013). Thyroid hormone receptors: The challenge of elucidating isotype-specific functions and cell-specific response. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3900–3907.
- Floreani, A. (2007). Liver diseases in the elderly: An Update. *Dig. Dis.* 25, 138–143.
- Forester, S.C., and Lambert, J.D. (2011). The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 844–854.
- Fraser, R., Dobbs, B.R., and Rogers, G.W. (1995). Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology* 21, 863–874.
- Freeman, M.L., and Meredith, M.J. (1988). Subcellular localization of glutathione and thermal sensitivity. *Radiat. Res.* 115, 461.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., and Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–502.
- Friesema, E.C.H., Jansen, J., Jachtenberg, J., Visser, W.E., Kester, M.H.A., and Visser, T.J. (2008). Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol. Endocrinol.* 22, 1357–1369.
- Fukuchi, Y., Hiramitsu, M., Okada, M., Hayashi, S., Nabeno, Y., Osawa, T., and Naito, M. (2008). Lemon polyphenols suppress diet-induced obesity by up-regulation of mRNA levels of the enzymes involved in beta-oxidation in mouse white adipose tissue. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 43, 201–209.
- Fukushima, M., Ohhashi, T., Ohno, S., Saitoh, H., Sonoyama, K., Shimada, K., Sekikawa, M., and Nakano, M. (2001). Effects of diets enriched in n-6 or n-3 fatty acids on cholesterol metabolism in older rats chronically fed a cholesterol-enriched diet. *Lipids* 36, 261–266.
- Furmaniak, J., and Smith, B.R. (1990). The structure of thyroid autoantigens. *Autoimmunity* 7, 63–80.
- Gaitan, E., Lindsay, R.H., Reichert, R.D., Ingbar, S.H., Cooksey, R.C., Legan, J., Meydrech, E.F., Hill, J., and Kubota, K. (1989). Antithyroid and goitrogenic effects of millet: Role of C-glycosylflavones*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68, 707–714.
- Gak, I.A., Radović, S.M., Dukić, A.R., Janjić, M.M., Stojkov-Mimić, N.J., Kostić, T.S., and Andrić, S.A. (2015). Stress triggers mitochondrial biogenesis to preserve steroidogenesis in Leydig cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853, 2217–2227.
- Gälman, C., Matasconi, M., Persson, L., Parini, P., Angelin, B., and Rudling, M. (2007). Age-induced hypercholesterolemia in the rat relates to reduced elimination but not increased intestinal absorption of cholesterol. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 293, E737–E742.
- Georgiadi, A., and Kersten, S. (2012). Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* 3, 127–134.

- Gérard, A.C., Many, M.C., Daumerie, C., Costagliola, S., Miot, F., DeVijlder, J.J.M., Colin, I.M., and Denef, J.F. (2002). Structural changes in the angiofollicular units between active and hypofunctioning follicles align with differences in the epithelial expression of newly discovered proteins involved in iodine transport and organification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 1291–1299.
- Gérard, A.C., Daumerie, C., Mestdagh, C., Gohy, S., de Burbure, C., Costagliola, S., Miot, F., Nollevaux, M.C., Denef, J.-F., Rahier, J., et al. (2003). Correlation between the loss of thyroglobulin iodination and the expression of thyroid-specific proteins involved in iodine metabolism in thyroid carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 4977–4983.
- Gérard, A.C., Denef, J.F., Colin, I.M., and van den Hove, M.F. (2004). Evidence for processing of compact insoluble thyroglobulin globules in relation with follicular cell functional activity in the human and the mouse thyroid. *Eur. J. Endocrinol.* *150*, 73–80.
- Gérard, A.C., Poncin, S., Audinot, J.N., Denef, J.F., and Colin, I.M. (2009). Iodide deficiency-induced angiogenic stimulus in the thyroid occurs via HIF- and ROS-dependent VEGF-A secretion from thyrocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *296*, E1414-22.
- Gerber, H., Studer, H., Conti, A., Engler, H., Kohler, H., and Haerberli, A. (1981). Reaccumulation of thyroglobulin and colloid in rat and mouse thyroid follicles during intense thyrotropin stimulation. A clue to the pathogenesis of colloid goiters. *J. Clin. Invest.* *68*, 1338–1347.
- Gereben, B., Zavacki, A.M., Ribich, S., Kim, B.W., Huang, S.A., Simonides, W.S., Zeöld, A., and Bianco, A.C. (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr. Rev.* *29*, 898–938.
- Ghezzi, A.C., Cambri, L.T., Botezelli, J.D., Ribeiro, C., Dalia, R.A., and de Mello, M.A.R. (2012). Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetol. Metab. Syndr.* *4*, 16.
- Gladine, C., Newman, J.W., Durand, T., Pedersen, T.L., Galano, J.-M.M., Demougeot, C., Berdeaux, O., Pujos-Guillot, E., Mazur, A., and Comte, B. (2014). Lipid profiling following intake of the omega 3 fatty acid DHA identifies the peroxidized metabolites F4-neuroprostanes as the best predictors of atherosclerosis prevention. *PLoS One* *9*, e89393.
- Glatzle, D., Vuilleumier, J.P., Weber, F., and Decker, K. (1974). Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* *30*, 665–667.
- Gnidehou, S., Caillou, B., Talbot, M., Ohayon, R., Kaniewski, J., Noël-Hudson, M.-S., Morand, S., Agnangji, D., Sezan, A., Courtin, F., et al. (2004). Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *FASEB J.* *18*, 1574–1576.
- Goldsworthy, M.E., and Potter, P.K. (2014). Modelling age-related metabolic disorders in the mouse. *Mamm. Genome* *25*, 487–496.
- Goldwasser, J., Cohen, P.Y., Yang, E., Balaguer, P., Yarmush, M.L., and Nahmias, Y. (2010). Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the

- grapefruit flavonoid naringenin: Role of PPAR α , PPAR γ and LXR α . *PLoS One* 5, e12399.
- Gong, Z., Kennedy, O., Sun, H., Wu, Y., Williams, G.A., Klein, L., Cardoso, L., Matheny, R.W., Hubbard, G.B., Ikeno, Y., et al. (2014). Reductions in serum IGF-1 during aging impair health span. *Aging Cell* 13, 408–418.
- Gonzalez-Covarrubias, V. (2013). Lipidomics in longevity and healthy aging. *Biogerontology* 14, 663–672.
- Gorinstein, S., Zachwieja, Z., Katrich, E., Pawelzik, E., Hauruenkit, R., Trakhtenberg, S., and Martinbelloso, O. (2004a). Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid. *Leb. Und-Technologie* 37, 337–343.
- Gorinstein, S., Caspi, A., Libman, I., Katrich, E., Lerner, H.T., and Trakhtenberg, S. (2004b). Preventive effects of diets supplemented with sweetie fruits in hypercholesterolemic patients suffering from coronary artery disease. *Prev. Med. (Baltim)*. 38, 841–847.
- Gorinstein, S., Caspi, A., Libman, I., Lerner, H.T., Huang, D., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Tashma, Z., Katrich, E., Feng, S., et al. (2006). Red grapefruit positively influences serum triglyceride level in patients suffering from coronary atherosclerosis: Studies in vitro and in humans. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1887–1892.
- Grompone, M.A. (2011). Sunflower oil. In *vegetable oils in food technology*, (Oxford, UK: Wiley-Blackwell), pp. 137–167.
- Grundy, S.M., Vega, G.L., and Bilheimer, D.W. (1985). Kinetic mechanisms determining variability in low density lipoprotein levels and rise with age. *Arteriosclerosis* 5, 623–630.
- Guan, Y., Hickey, M.J., Borgstahl, G.E.O., Hallewell, R.A., Lepock, J.R., O'Connor, D., Hsieh, Y., Nick, H.S., Silverman, D.N., and Tainer, J.A. (1998). Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34. *Biochemistry* 37, 4722–4730.
- Gundersen, H.J., and Jensen, E.B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* 147, 229–263.
- Halestrap, A.P. (2012). The monocarboxylate transporter family-structure and functional characterization. *IUBMB Life* 64, 1–9.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147–1150.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 1–8.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., and Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 119, 598–620.
- HAMPL, R., OSTATNIKOVA, D., CELEC, P., PUTZ, Z., LAPCİK, O., and MATUCHA, P. (2008). Short-term effect of soy consumption on thyroid hormone levels and correlation with phytoestrogen level in healthy subjects. *Endocr. Regul.* 42, 53–61.
- Hansen-Kyle, L. (2005). A concept analysis of healthy aging. *Nurs. Forum* 40, 45–57.

- Harris, D.M., Besselink, E., Henning, S.M., Go, V.L.W., and Heber, D. (2005). Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. *230*, 558–568.
- Harvey, C.B., Bassett, J.H.D., Maruvada, P., Yen, P.M., and Williams, G.R. (2007). The rat thyroid hormone receptor (TR) $\Delta\beta 3$ displays cell-, TR isoform-, and thyroid hormone response element-specific actions. *Endocrinology* *148*, 1764–1773.
- Hashimoto, T., and Ide, T. (2015). Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis in rats fed naringenin. *J. Agric. Food Chem.* *63*, 9536–9542.
- Hashimoto, K., Yamada, M., Matsumoto, S., Monden, T., Satoh, T., and Mori, M. (2006). Mouse sterol response element binding protein-1c Gene Expression Is Negatively Regulated by Thyroid Hormone. *Endocrinology* *147*, 4292–4302.
- Hashimoto, K., Matsumoto, S., Yamada, M., Satoh, T., and Mori, M. (2007). Liver X receptor- α gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* *148*, 4667–4675.
- He, J., Lee, J.H., Febbraio, M., and Xie, W. (2011). The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. *Exp. Biol. Med.* *236*, 1116–1121.
- Heindel, J.J., Skalla, L.A., Joubert, B.R., Dilworth, C.H., and Gray, K.A. (2017). Review of developmental origins of health and disease publications in environmental epidemiology. *Reprod. Toxicol.* *68*, 34–48.
- Hernandez, A., Park, J.P., Lyon, G.J., Mohandas, T.K., and St. Germain, D.L. (1998). Localization of the type 3 iodothyronine deiodinase (DIO3) gene to human chromosome 14q32 and mouse chromosome 12F1. *Genomics* *53*, 119–121.
- Herzog, V., Berndorfer, U., and Saber, Y. (1992). Isolation of insoluble secretory product from bovine thyroid: extracellular storage of thyroglobulin in covalently cross-linked form. *J. Cell Biol.* *118*, 1071–1083.
- Hildebrandt, J.D., Scranton, J.R., and Halmi, N.S. (1979). Intrathyroidally generated iodide: its measurement and origins. *Endocrinology* *105*, 618–626.
- Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M., and Mitsumori, K. (2001). Environmental agents, endocrine disrupting chemicals and rat thyroid carcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.* *14*, 71–77.
- Holzer, M., Trieb, M., Konya, V., Wadsack, C., Heinemann, A., and Marsche, G. (2013). Aging affects high-density lipoprotein composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* *1831*, 1442–1448.
- Huang, Y., Gusdon, A.M., and Qu, S. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: molecular pathways and therapeutic strategies. *Lipids Health Dis.* *12*, 171.
- Hulbert, A.J. (2008). Explaining longevity of different animals: is membrane fatty acid composition the missing link? *Age (Dordr)*. *30*, 89–97.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R., and Buttemer, W.A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.* *87*, 1175–1213.

- Huong, D.T.T., Takahashi, Y., and Ide, T. (2006). Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid oxidation in mice fed citrus flavonoids. *Nutrition* 22, 546–552.
- Iosco, C., Cosentino, C., Sirna, L., Romano, R., Cursano, S., Mongia, A., Pompeo, G., di Bernardo, J., Ceccarelli, C., Tallini, G., et al. (2014). Anoctamin 1 is apically expressed on thyroid follicular cells and contributes to ATP- and calcium-activated iodide efflux. *Cell. Physiol. Biochem.* 34, 966–980.
- Ito, M., Takamatsu, J., Matsuo, T., Kameoka, K., Kubota, S., Fukata, S., Tamai, H., Miyauchi, A., Kuma, K., and Hanafusa, T. (2003). Serum concentrations of remnant-like particles in hypothyroid patients before and after thyroxine replacement. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 58, 621–626.
- Jackson-Hayes, L., Song, S., Lavrentyev, E.N., Jansen, M.S., Hillgartner, F.B., Tian, L., Wood, P.A., Cook, G.A., and Park, E.A. (2003). A thyroid hormone response unit formed between the promoter and first intron of the carnitine palmitoyltransferase-1 α gene mediates the liver-specific induction by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 278, 7964–7972.
- Jain, A., Yadav, A., Bozhkov, A.I., Padalko, V.I., and Flora, S.J.S. (2011). Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 607–614.
- Jakobs, T.C., Schmutzler, C., Meissner, J., and Kohrle, J. (1997). The promoter of the human type I 5'-deiodinase gene - mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid-hormone-responsive element. *Eur. J. Biochem.* 247, 288–297.
- Johannes, J., Jayarama-Naidu, R., Meyer, F., Wirth, E.K., Schweizer, U., Schomburg, L., Köhrle, J., and Renko, K. (2016). Silychristin, a flavonolignan derived from the milk thistle, is a potent inhibitor of the thyroid hormone transporter MCT8. *Endocrinology* 157, 1694–1701.
- Johnson, K.A., Bernard, M.A., and Funderburg, K. (2002). Vitamin nutrition in older adults. *Clin. Geriatr. Med.* 18, 773–799.
- Jones, C.M., and Boelaert, K. (2014). The endocrinology of ageing: A mini-review. *Gerontology* 61, 291–300.
- Juge-Aubry, C.E., Gorla-Bajszczak, A., Pernin, A., Lemberger, T., Wahli, W., Burger, A.G., and Meier, C.A. (1995). Peroxisome proliferator-activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid X receptor. Possible role of a leucine zipper-like heptad repeat. *J. Biol. Chem.* 270, 18117–18122.
- Jung, U.J., Kim, H.J., Lee, J.S., Lee, M.K., Kim, H.O., Park, E.J., Kim, H.K., Jeong, T.S., and Choi, M.S. (2003). Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects. *Clin. Nutr.* 22, 561–568.
- Kalaany, N.Y., and Mangelsdorf, D.J. (2006). LXRS and FXR: The Yin and Yang of Cholesterol and Fat Metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 159–191.
- Kalita, J.C., and Milligan, S.R. (2010). In vitro estrogenic potency of phytoestrogen-glycosides and some plant flavanoids. *Indian J. Sci. Technol. Indian J.Sci.Technol* 3.

- Kanaze, F.I., Bounartzi, M.I., Georgarakis, M., and Niopas, I. (2007). Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* *61*, 472–477.
- Kardum, N., Takić, M., Šavikin, K., Zec, M., Zdunić, G., Spasić, S., and Konić-Ristić, A. (2014). Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. *J. Funct. Foods* *9*, 89–97.
- Ke, J.-Y., Kliewer, K.L., Hamad, E.M., Cole, R.M., Powell, K.A., Andridge, R.R., Straka, S.R., Yee, L.D., and Belury, M.A. (2015). The flavonoid, naringenin, decreases adipose tissue mass and attenuates ovariectomy-associated metabolic disturbances in mice. *Nutr. Metab. (Lond)*. *12*, 1.
- Khan, M.K., Zill-E-Huma, and Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* *33*, 85–104.
- Khansari, N., Shakiba, Y., and Mahmoudi, M. (2009). Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* *3*, 73–80.
- Kim, S., and Park, T.I. (2013). Naringenin: a partial agonist on estrogen receptor in T47D-KBluc breast cancer cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.* *6*, 890–899.
- Kim, E.S., Lim, D.J., Baek, K.H., Lee, J.M., Kim, M.K., Kwon, H.S., Song, K.H., Kang, M.I., Cha, B.Y., Lee, K.W., et al. (2010). Thyroglobulin antibody is associated with increased cancer risk in thyroid nodules. *Thyroid* *20*, 885–891.
- Kim, H.K., Jeong, T.-S., Lee, M.-K., Park, Y.B., and Choi, M.-S. (2003). Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin. Chim. Acta.* *327*, 129–137.
- Kim, I.H., Kisseleva, T., and Brenner, D.A. (2015). Aging and liver disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *31*, 184–191.
- Kim, W.R., Flamm, S.L., Di Bisceglie, A.M., and Bodenheimer, H.C. (2008). Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology* *47*, 1363–1370.
- Kinlaw, W.B., Tron, P., and Witters, L.A. (1993). Thyroid hormone and dietary carbohydrate induce different hepatic zonation of both spot 14 and acetyl-coenzyme-A carboxylase: a novel mechanism of coregulation. *Endocrinology* *133*, 645–650.
- Kinlaw, W.B., Church, J.L., Harmon, J., and Mariash, C.N. (1995). Direct evidence for a role of the spot 14 protein in the regulation of lipid synthesis. *J. Biol. Chem.* *270*, 16615–16618.
- Kinne, A., Kleinau, G., Hoefig, C.S., Grüters, A., Köhrle, J., Krause, G., and Schweizer, U. (2010). Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8. *J. Biol. Chem.* *285*, 28054–28063.
- Klug, T.L., and Adelman, R.C. (1979). Altered hypothalamic-pituitary regulation of thyrotropin in male rats during aging. *Endocrinology* *104*, 1136–1142.
- Köehrle, J. (2000). *The thyroid and environment. Flavonoids as a risk factor for goiter and hypothyroidism.* (Stuttgart: Schattauer).

- Koenig, R.J. (2005). Regulation of type 1 iodothyronine deiodinase in health and disease. *Thyroid* 15, 835–840.
- Kogai, T., Endo, T., Saito, T., Miyazaki, A., Kawaguchi, A., and Onaya, T. (1997). Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 Cells. *Endocrinology* 138, 2227–2232.
- Kohli, P., and Levy, B.D. (2009). Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 158, 960–971.
- Köhrle, J. (2000). Flavonoids as a risk factor for goiter and hypothyroidism. In *The thyroid and environment.*, H.U. Péter F, Wiersinga WM, ed. (Schattauer: Proceedings of the Merck European Thyroid Symposium. Stuttgart/New York), pp. 41–63.
- Köhrle, J., Spanka, M., Irmscher, K., and Hesch, R.D. (1988). Flavonoid effects on transport, metabolism and action of thyroid hormones. *Prog. Clin. Biol. Res.* 280, 323–340.
- Köhrle, J., Fang, S.L., Yang, Y., Irmscher, K., Hesch, R.D., Pino, S., Alex, S., and Braverman, L.E. (1989). Rapid effects of the flavonoid EMD 21388 on serum thyroid hormone binding and thyrotropin regulation in the rat*. *Endocrinology* 125, 532–537.
- Koonen, D.P.Y., Jacobs, R.L., Febbraio, M., Young, M.E., Soltys, C.-L.M., Ong, H., Vance, D.E., and Dyck, J.R.B. (2007). Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 2863–2871.
- Kopp, P.A. (2008). Reduce, recycle, reuse — iodotyrosine deiodinase in thyroid iodide metabolism. *N. Engl. J. Med.* 358, 1856–1859.
- Kotani, T., and Ohtaki, S. (1987). Characterization of thyroid follicular cell apical plasma membrane peroxidase using monoclonal antibody. *Endocrinol. Jpn.* 34, 407–413.
- Krishna, M. (2013). Role of special stains in diagnostic liver pathology. *Clin. Liver Dis.* 2, S8–S10.
- Krishnamurthy, P., and Wadhvani, A. (2012). Antioxidant enzymes and human health. In *Antioxidant Enzyme*, (InTech), DOI: 10.5772/48109.
- Kronenberg, H.M. (2016). Bone and mineral metabolism: Where are we, where are we going, and how will we get there? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 795–798.
- Krupp, P.P., and Lee, K.P. (1986). Ultrastructure and cytochemistry of thyroid lysosomes following subtotal thyroidectomy. *Anat. Rec.* 214, 177–182.
- Kuhla, A., Blei, T., Jaster, R., and Vollmar, B. (2011). Aging is associated with a shift of fatty metabolism toward lipogenesis. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 66A, 1192–1200.
- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., and Gustafsson, J.-Å. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139, 4252–4263.
- Kumar, S., and Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci. World J.* 2013, 162750.
- Kumar Sharma, A., Bharti, S., Ojha, S., Bhatia, J., Kumar, N., Ray, R., Kumari, S., and Singh Arya, D. (2011). Up-regulation of PPAR γ , heat shock protein-27 and -72 by

- naringin attenuates insulin resistance, β -cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes. *Br. J. Nutr.* *106*, 1713–1723.
- Larsen, P.R. (2009). Type 2 iodothyronine deiodinase in human skeletal muscle: new insights into its physiological role and regulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 1893–1895.
- Lee, D.H., Blomhoff, R., and Jacobs, D.R. (2004). Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic. Res.* *38*, 535–539.
- Lee, J., Yi, S., Kang, Y.E., Kim, H.-W., Joung, K.H., Sul, H.J., Kim, K.S., and Shong, M. (2016). Morphological and functional changes in the thyroid follicles of the aged murine and humans. *J. Pathol. Transl. Med.* *50*, 426–435.
- Lee, J.S., Ward, W.O., Wolf, D.C., Allen, J.W., Mills, C., DeVito, M.J., and Corton, J.C. (2008). Coordinated changes in xenobiotic metabolizing enzyme gene expression in aging male rats. *Toxicol. Sci.* *106*, 263–283.
- Lee, J.S., Ward, W.O., Liu, J., Ren, H., Vallanat, B., Delker, D., and Corton, J.C. (2011). Hepatic xenobiotic metabolizing enzyme and transporter gene expression through the life stages of the mouse. *PLoS One* *6*, e24381.
- Leonard, J.L., and Rosenberg, I.N. (1978). Subcellular distribution of thyroxine 5'-deiodinase in the rat kidney: A plasma membrane location*. *Endocrinology* *103*, 274–280.
- Li, G.-X., Chen, Y.-K., Hou, Z., Xiao, H., Jin, H., Lu, G., Lee, M.-J., Liu, B., Guan, F., Yang, Z., et al. (2010). Pro-oxidative activities and dose–response relationship of (2)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study in vivo and in vitro. *Carcinogenesis* *31*, 902–910.
- Li, L., Bonneton, F., Chen, X.Y., and Laudet, V. (2015). Botanical compounds and their regulation of nuclear receptor action: The case of traditional Chinese medicine. *Mol. Cell. Endocrinol.* *401*, 221–237.
- Lima Gonçalves, C.F., de Souza dos Santos, M.C., Ginabreda, M.G., Soares Fortunato, R., Pires de Carvalho, D., and Freitas Ferreira, A.C. (2013). Flavonoid rutin increases thyroid iodide uptake in rats. *PLoS One* *8*, 1–12.
- Lin, X., Ryu, K.-Y., and Jhiang, S.M. (2004). Cloning of the 5'-flanking region of mouse sodium/iodide symporter and identification of a thyroid-specific and TSH-responsive enhancer. *Thyroid* *14*, 19–27.
- Liu, Y.-Y., and Brent, G.A. (2010). Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends Endocrinol. Metabol.* *21*, 166–173.
- Luccio-Camelo, D.C., and Prins, G.S. (2011). Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *127*, 74–82.
- Macqueen, H.A., Wassif, W.S., Walker, I., Sadler, D.A., and Evans, K. (2011). Age-related biomarkers can be modulated by diet in the rat *. *Food Nutr. Sci.* *2*, 884–890.
- Majima, H.J., Oberley, T.D., Furukawa, K., Mattson, M.P., Yen, H.C., Szweda, L.I., and St Clair, D.K. (1998). Prevention of mitochondrial injury by manganese superoxide dismutase reveals a primary mechanism for alkaline-induced cell death. *J. Biol. Chem.* *273*, 8217–8224.

- Malik, R., and Hodgson, H. (2002). The relationship between the thyroid gland and the liver. *QJM* 95, 559–569.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schittq5, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83, 835–839.
- Mangelsdorf, I., Buschmann, J., and Orthen, B. (2003). Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 356–369.
- Mao, Y., Yu, F., Wang, J., Guo, C., and Fan, X. (2016). Autophagy: a new target for nonalcoholic fatty liver disease therapy. *Hepat. Med.* 8, 27–37.
- Mariotti, S., Franceschi, C., Cossarizza, A., and Pinchera, N. (1995). The aging thyroid. *Endocr. Rev.* 16, 686–715.
- Martin-Lacave, I., Conde, E., Montero, C., and Galera-Davidson, H. (1992). Quantitative changes in the frequency and distribution of the C-cell population in the rat thyroid gland with age. *Cell Tissue Res.* 270, 73–77.
- McCann, J.C., and Ames, B.N. (2011). Adaptive dysfunction of selenoproteins from the perspective of the triage theory: why modest selenium deficiency may increase risk of diseases of aging. *FASEB J.* 25, 1793–1814.
- McCuskey, R.S. (2000). Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* 20, 3–7.
- McCuskey, R., and Reilly, F. (1993). Hepatic microvasculature: Dynamic structure and its regulation. *Semin. Liver Dis.* 13, 1–12.
- Mennen, L.I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., and Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 326S–329S.
- Meredith, D., and Christian, H.C. (2008). The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica* 38, 1072–1106.
- Messarah, M., Saoudi, M., Boumendjel, A., Boulakoud, M.S., and Feki, A. El (2011). Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 33–41.
- Miler, M., Šošić-Jurjević, B., Nestorović, N., Ristić, N., Medigović, I., Savin, S., and Milošević, V. (2014). Morphological and functional changes in pituitary-thyroid axis following prolonged exposure of female rats to constant light. *J. Morphol.* 275, 1161–1172.
- De Minicis, S., Marzioni, M., Benedetti, A., and Svegliati-Baroni, G. (2013). New insights in hepatocellular carcinoma: from bench to bedside. *Ann. Transl. Med.* 1, 15.
- Misra, H.P., and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Miyamoto, T., Suzuki, S., and DeGroot, L.J. (1993). High affinity and specificity of dimeric binding of thyroid hormone receptors to DNA and their ligand-dependent dissociation. *Mol. Endocrinol.* 7, 224–231.

- Mondal, S., Raja, K., Schweizer, U., and Muges, G. (2016). Chemistry and biology in the biosynthesis and action of thyroid hormones. *Angew. Chemie Int. Ed.* *55*, 7606–7630.
- Moreira, D.G., Marassi, M.P., Corrêa Da Costa, V.M., Carvalho, D.P., and Rosenthal, D. (2005). Effects of ageing and pharmacological hypothyroidism on pituitary-thyroid axis of Dutch-Miranda and Wistar rats. *Exp. Gerontol.* *40*, 330–334.
- Morganti, S., Ceda, G.P., Saccani, M., Milli, B., Ugolotti, D., Prampolini, R., Maggio, M., Valenti, G., and Ceresini, G. (2005). Thyroid disease in the elderly: Sex-related differences in clinical expression. *J. Endocrinol. Invest.* *28*, 101–104.
- Mori, K., Blackshear, P.E., Lobenhofer, E.K., Parker, J.S., Orzech, D.P., Roycroft, J.H., Walker, K.L., Johnson, K.A., Marsh, T.A., Irwin, R.D., et al. (2007). Hepatic transcript levels for genes coding for enzymes associated with xenobiotic metabolism are altered with age. *Toxicol. Pathol.* *35*, 242–251.
- Morin, B., Nichols, L.A., Zalasky, K.M., Davis, J.W., Manthey, J.A., and Holland, L.J. (2008). The citrus flavonoids hesperetin and nobiletin differentially regulate low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 liver cells. *J. Nutr.* *138*, 1274–1281.
- Moskaug, J.Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M.C.W., and Blomhoff, R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* *81*, 277S–283S.
- Moudgal, N.R., Raghupathy, E., and Sarma, P.S. (1958). Studies on goitrogenic agents in food. III. Goitrogenic action of some glycosides isolated from edible nuts. *J. Nutr.* *66*, 291–303.
- Mugford, C.A., and Kedderis, G.L. (1998). Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* *30*, 441–498.
- Müller, J., and Heuer, H. (2012). Understanding the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in mct8 deficiency. *Eur. Thyroid J.* *1*, 72–79.
- Mullur, R., Liu, Y.-Y., and Brent, G.A. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* *94*, 355–382.
- Mulvihill, E.E., and Drucker, D.J. (2014). Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocr. Rev.* *35*, 992–1019.
- Mulvihill, E.E., Allister, E.M., Sutherland, B.G., Telford, D.E., Sawyez, C.G., Edwards, J.Y., Markle, J.M., Hegele, R.A., and Huff, M.W. (2009). Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes* *58*, 2198–2210.
- Mulvihill, E.E., Burke, A.C., and Huff, M.W. (2016). citrus flavonoids as regulators of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Annu. Rev. Nutr.* *36*, 275–299.
- Myhrstad, M.C.W., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R., and Moskaug, J.Ø. (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic. Biol. Med.* *32*, 386–393.
- Narasimhan, S., Gokulakrishnan, K., Sampathkumar, R., Farooq, S., Ravikumar, R., Mohan, V., and Balasubramanyam, M. (2010). Oxidative stress is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in subjects with and without type 2 diabetes. *Clin. Biochem.* *43*, 815–821.

- Nassir, F., Adewole, O.L., Brunt, E.M., and Abumrad, N.A. (2013). CD36 deletion reduces VLDL secretion, modulates liver prostaglandins, and exacerbates hepatic steatosis in ob/ob mice. *J. Lipid Res.* *54*, 2988–2997.
- Nguyen, T.T., Chapa, F., and Distefano Iii, J.J. (1998). Direct Measurement of the Contributions of type I and type II 5'-deiodinases to whole body steady state 3,5,3'-triiodothyronine production from thyroxine in the rat*. *Endocrinology* *139*, 4626–4633.
- Nichols, L.A., Jackson, D.E., Manthey, J.A., Shukla, S.D., and Holland, L.J. (2011). Citrus flavonoids repress the mRNA for stearoyl-CoA desaturase, a key enzyme in lipid synthesis and obesity control, in rat primary hepatocytes. *Lipids Health Dis.* *10*, 36.
- Ntambi, J.M. (1995). The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res.* *34*, 139–150.
- Ortiga-Carvalho, T.M., Sidhaye, A.R., and Wondisford, F.E. (2014). Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 582–591.
- Oschry, Y., and Eisenberg, S. (1982). Rat plasma lipoproteins: Re-evaluation of a lipoprotein system in an animal devoid of cholesteryl ester transfer activity. *J. Lipid Res.* *23*, 1099–1106.
- Oteiza, P.I., Erlejman, A.G., Verstraeten, S. V, Keen, C.L., and Fraga, C.G. (2005). Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clin. Dev. Immunol.* *12*, 19–25.
- Paglia, D.E., and Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* *70*, 158–169.
- Palha, J.A. (2002). Transthyretin as a thyroid hormone carrier: Function revisited. *Clin. Chem. Lab. Med.* *40*, 1292–1300.
- Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1777*, 1249–1262.
- Pan, M.-R., Li, K., Lin, S.-Y., and Hung, W.-C. (2016). Connecting the dots: From DNA damage and repair to aging. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 685.
- Panda, S., and Kar, A. (2014). Antithyroid effects of naringin, hesperidin and rutin in I-T₄ induced hyperthyroid rats: Possible mediation through 5'DI activity. *Pharmacol. Reports* *66*, 1092–1099.
- Pari, L., and Gnanasoundari, M. (2006). Influence of naringenin on oxytetracycline mediated oxidative damage in rat liver. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *98*, 456–461.
- Parini, P., Angelin, B., and Rudling, M. (1999). Cholesterol and lipoprotein metabolism in aging. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *19*, 832–839.
- Peel, N.M., McClure, R.J., and Bartlett, H.P. (2005). Behavioral determinants of healthy aging. *Am. J. Prev. Med.* *28*, 298–304.
- Peeters, R.P., van den Beld, A.W., Attalki, H., Toor, H. van, de Rijke, Y.B., Kuiper, G.G.J.M., Lamberts, S.W.J., Janssen, J.A.M.J.L., Uitterlinden, A.G., and Visser, T.J. (2005). A new polymorphism in the type II deiodinase gene is associated with circulating thyroid hormone parameters. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *289*.

- Peeters, R.P., van der Deure, W.M., and Visser, T.J. (2006). Genetic variation in thyroid hormone pathway genes; polymorphisms in the TSH receptor and the iodothyronine deiodinases. *Eur. J. Endocrinol.* *155*, 655–662.
- Pellegrini, M., Bulzomi, P., Lecis, M., Leone, S., Campesi, I., Franconi, F., and Marino, M. (2014). Endocrine disruptors differently influence estrogen receptor β and androgen receptor in male and female rat VSMC. *J. Cell. Physiol.* *229*, 1061–1068.
- Penel, C., Bastiani, P., and Rognoni, J.B. (1982). Correlation between thyroid-follicle fusion and structural modifications of the epithelial cells. A quantitative study in the adult rat. *Cell Tissue Res.* *225*, 143–153.
- Penel, C., Rognoni, J.B., and Bastiani, P. (1985). Thyroid morphological and functional heterogeneity: impact on iodine secretion. *Gen. Physiol. Biophys.* *4*, 55–68.
- Pérez-Vargas, J.E., Zarco, N., Shibayama, M., Segovia, J., Tsutsumi, V., and Muriel, P. (2014). Hesperidin prevents liver fibrosis in rats by decreasing the expression of nuclear factor- κ B, transforming growth factor- β and connective tissue growth factor. *Pharmacology* *94*, 80–89.
- Perron, N.R., and Brumaghim, J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* *53*, 75–100.
- Peterson, J.J., Beecher, G.R., Bhagwat, S.A., Dwyer, J.T., Gebhardt, S.E., Haytowitz, D.B., and Holden, J.M. (2006a). Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food Compos. Anal.* *19*, S74–S80.
- Peterson, J.J., Dwyer, J.T., Beecher, G.R., Bhagwat, S. a., Gebhardt, S.E., Haytowitz, D.B., and Holden, J.M. (2006b). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food Compos. Anal.* *19*, 66–73.
- Petrulea, M., Muresan, A., and Duncea, I. (2012). Oxidative stress and antioxidant status in hypo- and hyperthyroidism. *Intech* 197–236.
- Pham-Huy, L.A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* *4*, 89–96.
- Pickart, L. (1983). Increased ratio of plasma free fatty acids to albumin during normal aging and in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* *46*, 21–28.
- Pitts, M.W., and Hoffmann, P.R. (2017). Endoplasmic reticulum-resident selenoproteins as regulators of calcium signaling and homeostasis. *Cell Calcium*.
- Pizzagalli, F., Hagenbuch, B., Stieger, B., Klenk, U., Folkers, G., and Meier, P.J. (2002). Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol. Endocrinol.* *16*, 2283–2296.
- Ponsins, G., Pulcinis, T., Sparrows, J.T., Gotto, A.M., and Pownallot, H.J. (1993). High density lipoprotein interconversions in rat and man as assessed with a novel nontransferable apolipoprotein*. *J. Biol. Chem.* *268*, 3114–3119.
- Popović, T., Borozan, S., Arsić, A., Martaćić, J.D., Vučić, V., Trbović, A., Mandić, L., and Glibetić, M. (2012). Fish oil supplementation improved liver phospholipids fatty acid composition and parameters of oxidative stress in male wistar rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* *96*, 1020–1029.

- Pu, P., Gao, D.-M., Mohamed, S., Chen, J., Zhang, J., Zhou, X.-Y., Zhou, N.-J., Xie, J., and Jiang, H. (2012). Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Arch. Biochem. Biophys.* *518*, 61–70.
- van der Putten, H.H.A.G.M., Friesema, E.C.H., Abumrad, N.A., Everts, M.E., and Visser, T.J. (2003). Thyroid hormone transport by the rat fatty acid translocase. *Endocrinology* *144*, 1315–1323.
- Radović, B., Mentrup, B., and Köhrle, J. (2006). Genistein and other soya isoflavones are potent ligands for transthyretin in serum and cerebrospinal fluid. *Br. J. Nutr.* *95*, 1171–1176.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging* *2*, 219–236.
- Rahman, I., Kode, A., and Biswas, S.K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* *1*, 3159–3165.
- Rao-Rupanagudi, S., Heywood, R., and Gopinath, C. (1992). Age-related changes in thyroid structure and function in Sprague-Dawley rats. *Vet. Pathol.* *29*, 278–287.
- Recchiuti, A. (2014). Immunoresolving lipid mediators and resolution of inflammation in aging. *J. Gerontol. Geriatr. Res.* *3*, 1–17.
- Refetoff, S. (2000). Thyroid hormone serum transport proteins (Updated 2015 Jun 7) In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. *Endotext* (Internet). South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-..
- Ren, B., Thelen, A.P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., and Jump, D.B. (1997). Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J. Biol. Chem.* *272*, 26827–26832.
- Renugadevi, J., and Prabu, S.M. (2010). Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. *Exp. Toxicol. Pathol.* *62*, 171–181.
- Ribeiro, R.C., Kushner, P.J., Apriletti, J.W., West, B.L., and Baxter, J.D. (1992). Thyroid hormone alters in vitro DNA binding of monomers and dimers of thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* *6*, 1142–1152.
- Richardson, S.J. (2009). Evolutionary changes to transthyretin: evolution of transthyretin biosynthesis. *FEBS J.* *276*, 5342–5356.
- Riese, C., Michaelis, M., Mentrup, B., Götz, F., Köhrle, J., Schweizer, U., and Schomburg, L. (2006). Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology* *147*, 5883–5892.
- Ristić, V. (1991). Uticaj diazepama i alkohola na lipide krvne plazme i jetre kod pacova. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Institut za medicinska istraživanja.
- de Roos, B., and Duthie, G.G. (2015). Role of dietary pro-oxidants in the maintenance of health and resilience to oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* *59*, 1229–1248.

- Roth, M., Obaidat, A., and Hagenbuch, B. (2012). OATPs, OATs and OCTs: The organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 1260–1287.
- Rousset, B., Dupuy, C., Miot, F., and Dumont, J. (2000). Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion (MDText.com, Inc.).
- Rudolph, M.C., Wellberg, E.A., Lewis, A.S., Terrell, K.L., Merz, A.L., Maluf, N.K., Serkova, N.J., and Anderson, S.M. (2014). Thyroid hormone responsive protein Spot14 enhances catalysis of fatty acid synthase in lactating mammary epithelium. *J. Lipid Res.* *55*, 1052–1065.
- Ruiz-Gutiérrez, V., Pérez-Espinosa, A., Vázquez, C.M., and Santa-María, C. (1999). Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br. J. Nutr.* *82*, 233–241.
- Sajid-Crockett, S., and Hershman, J. (2000). Thyroid Nodules and Cancer in the Elderly (MDText.com, Inc.).
- Salvatore, D., Simonides, W.S., Dentice, M., Zavacki, A.M., and Larsen, P.R. (2013). Thyroid hormones and skeletal muscle—new insights and potential implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 206–214.
- Samuels, H.H., Forman, B.M., Horowitz, Z.D., and Ye, Z.S. (1988). Regulation of gene expression by thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* *81*, 957–967.
- Sanchez-Muniz, F.J., and Bastida, S. (2008). Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *110*, 295–301.
- Savu, L., Vranckx, R., Marielle, R.-R., Maya, M., Nunez, E.A., Tr?ton, J., and Fink, I.L. (1991). A senescence up-regulated protein: the rat thyroxine-binding globulin (TBG). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* *1097*, 19–22.
- Schmucker, D.L. (2005). Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease? *Exp. Gerontol.* *40*, 650–659.
- Schmutzler, C., Hamann, I., Hofmann, P.J., Kovacs, G., Stemmler, L., Mentrup, B., Schomburg, L., Ambrugger, P., Grüters, A., Seidlova-Wuttke, D., et al. (2004). Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* *205*, 95–102.
- Schneider, P.B. (1964). Thyroidal iodine heterogeneity: Last come, first served? System of iodine turnover. *Endocrinology* *74*, 973–980.
- Schneider, M.J., Fiering, S.N., Pallud, S.E., Parlow, A.F., St. Germain, D.L., and Galton, V.A. (2001). Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T₄. *Mol. Endocrinol.* *15*, 2137–2148.
- Schneider, M.J., Fiering, S.N., Thai, B., Wu, S., St. Germain, E., Parlow, A.F., St. Germain, D.L., and Galton, V.A. (2006). Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* *147*, 580–589.
- Schomburg, L., and Lutz (2016). Dietary selenium and human health. *Nutrients* *9*, 22.

- Schomburg, L., Riese, C., Renko, K., and Schweizer, U. (2007). Effect of age on sexually dimorphic selenoprotein expression in mice. *Biol. Chem.* *388*, 1035–1041.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* *14*, 2831–2838.
- Schweizer, U., Weitzel, J.M., and Schomburg, L. (2008). Think globally: Act locally. *Mol. Cell. Endocrinol.* *289*, 1–9.
- Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E. (2008). Resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* *8*, 349–361.
- Serot, J.M., Christmann, D., Dubost, T., and Couturier, M. (1997). Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *63*, 506–508.
- Sevo, G., Davidovic, M., Erceg, P., Despotovic, N., Milosevic, D.P., and Tasic, M. (2015). On aging and aged care in Serbia. *J. Cross. Cult. Gerontol.* *30*, 217–231.
- Shanle, E.K., and Xu, W. (2011). Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicology* *24*, 6–19.
- Sheedfar, F., Biase, S. Di, Koonen, D., and Vinciguerra, M. (2013). Liver diseases and aging: Friends or foes? *Aging Cell* *12*, 950–954.
- Sheedfar, F., Sung, M.M., Aparicio-Vergara, M., Kloosterhuis, N.J., Miquilena-Colina, M.E., Vargas-Castrillón, J., Febbraio, M., Jacobs, R.L., de Bruin, A., Vinciguerra, M., et al. (2014). Increased hepatic CD36 expression with age is associated with enhanced susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Aging (Albany, NY)*. *6*, 281–295.
- Shin, D.-J., and Osborne, T.F. (2003). Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2). *J. Biol. Chem.* *278*, 34114–34118.
- Shin, Y.W., Bok, S.H., Jeong, T.S., Bae, K.H., Jeoung, N.H., Choi, M.S., Lee, S.H., and Park, Y.B. (1999). Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* *69*, 341–347.
- Silvestri, E., Lombardi, A., de Lange, P., Schiavo, L., Lanni, A., Goglia, F., Visser, T.J., and Moreno, M. (2008). Age-related changes in renal and hepatic cellular mechanisms associated with variations in rat serum thyroid hormone levels. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *294*, E1160–E1168.
- Sinha, R.A., You, S.-H., Zhou, J., Siddique, M.M., Bay, B.-H., Zhu, X., Privalsky, M.L., Cheng, S.-Y., Stevens, R.D., Summers, S.A., et al. (2012). Thyroid hormone stimulates hepatic lipid catabolism via activation of autophagy. *J. Clin. Invest.* *122*, 2428–2438.
- Sinha, R.A., Singh, B.K., and Yen, P.M. (2014). Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* *25*, 538–545.
- Smeds, S. (1972). A Microgel electrophoretic analysis of the colloid proteins in single rat thyroid follicles. II. The protein concentration of the colloid in single rat thyroid follicles. *Endocrinology* *91*, 1300–1306.

- Šošić-Jurjević, B., Filipović, B., Renko, K., Ajdžanović, V., Manojlović-Stojanoski, M., Milošević, V., and Köhrle, J. (2012). Orchidectomy of middle-aged rats decreases liver deiodinase 1 and pituitary deiodinase 2 activity. *J. Endocrinol.* *215*, 247–256.
- Šošić-Jurjević, B., Filipović, B., Ajdžanović, V., Savin, S., Nestorović, N., Milošević, V., and Sekulić, M. (2010). Suppressive effects of genistein and daidzein on pituitary-thyroid axis in orchidectomized middle-aged rats. *Biol. Med.* *235*, 590–598.
- Šošić-Jurjević, B., Filipović, B., Wirth, E.K., Živanović, J., Radulović, N., Janković, S., Milošević, V., and Köhrle, J. (2014). Soy isoflavones interfere with thyroid hormone homeostasis in orchidectomized middle-aged rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *278*, 124–134.
- Šošić-Jurjević, B., Filipović, B., Renko, K., Miler, M., Trifunović, S., Ajdžanović, V., Köhrle, J., and Milošević, V. (2015). Testosterone and estradiol treatments differently affect pituitary-thyroid axis and liver deiodinase 1 activity in orchidectomized middle-aged rats. *Exp. Gerontol.* *72*, 85–98.
- de Souza dos Santos, M.C., Gonçalves, C.F.L., Vaisman, M., Ferreira, A.C.F., and de Carvalho, D.P. (2011). Impact of flavonoids on thyroid function. *Food Chem. Toxicol.* *49*, 2495–2502.
- Speisky, H. (1992). Age-dependent removal of circulating glutathione by rat liver: role of gamma-glutamyl transferase. *Age (Omaha)*. *15*, 104–107.
- Sullivan-Gunn, M.J., and Lewandowski, P.A. (2013). Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia. *BMC Geriatr.* *13*, 104.
- Suzuki, K., Kawashima, A., Yoshihara, A., Akama, T., Sue, M., Yoshida, A., and Kimura, H.J. (2011). REVIEW Role of thyroglobulin on negative feedback autoregulation of thyroid follicular function and growth. *J. Endocrinol.* *209*, 169–174.
- Takaoka, M., Teranishi, M., Furukawa, T., Manabe, S., and Goto, N. (1995). Age-related changes in thyroid lesions and function in F344/DuCrj rats. *Exp. Anim.* *44*, 57–62.
- Tan, K.C.B., Shiu, S.W.M., and Kung, A.W.C. (1998). Effect of thyroid dysfunction on high-density lipoprotein subfraction metabolism: Roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83*, 2921–2924.
- Tang, L., Zhou, J., Yang, C.-H., Xia, B.-J., Hu, M., and Liu, Z.-Q. (2012). Systematic studies of sulfation and glucuronidation of 12 flavonoids in the mouse liver S9 fraction reveal both unique and shared positional preferences. *J. Agric. Food Chem.* *60*, 3223–3233.
- Thomas, N.O., Shay, K.P., Kelley, A.R., Butler, J.A., and Hagen, T.M. (2016). Glutathione maintenance mitigates age-related susceptibility to redox cycling agents. *Redox Biol.* *10*, 45–52.
- Tiwari, B.K., Pandey, K.B., Abidi, A.B., and Rizvi, S.I. (2013). Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. *J. Biomark.* *2013*, 378790.
- Tollet-Egnell, P., Flores-Morales, A., Ståhlberg, N., Malek, R.L., Lee, N., and Norstedt, G. (2001). Gene expression profile of the aging process in rat liver: Normalizing effects of growth hormone replacement. *Mol. Endocrinol.* *15*, 308–318.

- Townsend, D.M., Tew, K.D., and Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* *57*, 145–155.
- Toyoda, N., Zavacki, A.M., Maia, A.L., Harney, J.W., and Larsen, P.R. (1995). A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 5100–5112.
- Uchiyama, Y., Murakami, G., and Igarashi, M. (1986). Changes in colloid droplets and dense bodies in rat thyroid follicular cells during 24 hours: Fine structural and morphometric studies. *Am. J. Anat.* *175*, 15–22.
- Ulven, S.M., Dalen, K.T., Gustafsson, J.-A., and Nebb, H.I. (2005). LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* *73*, 59–63.
- Upadhyay, S., and Dixit, M. (2015). Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2015*, 1–15.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M.J., and Spencer, J.P.E. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* *2*, 1106–1131.
- Vauzour, D., Tejera, N., O'Neill, C., Booz, V., Jude, B., Wolf, I.M.A., Rigby, N., Silvan, J.M., Curtis, P.J., Cassidy, A., et al. (2015). Anthocyanins do not influence long-chain n-3 fatty acid status: Studies in cells, rodents and humans. *J. Nutr. Biochem.* *26*, 211–218.
- Vijay, V., Han, T., Moland, C.L., Kwekel, J.C., Fuscoe, J.C., and Desai, V.G. (2015). Sexual dimorphism in the expression of mitochondria-related genes in rat heart at different ages. *PLoS One* *10*, e0117047.
- Visser, T.J. (1996). Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta Med. Austriaca* *23*, 10–16.
- Visser, T.J., Kaptein, E., Glatt, H., Bartsch, I., Hagen, M., and Coughtrie, M.W. (1998). Characterization of thyroid hormone sulfotransferases. *Chem. Biol. Interact.* *109*, 279–291.
- Visser, W.E., Friesema, E.C.H., Jansen, J., and Visser, T.J. (2007). Thyroid hormone transport by monocarboxylate transporters. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *21*, 223–236.
- Visser, W.E., Bombardieri, C.R., Zevenbergen, C., Barnhoorn, S., Ottaviani, A., van der Pluijm, I., Brandt, R., Kaptein, E., van Heerebeek, R., van Toor, H., et al. (2016). Tissue-specific suppression of thyroid hormone signaling in various mouse models of aging. *PLoS One* *11*, e0149941.
- Vitale, G., Salvioli, S., and Franceschi, C. (2013). Oxidative stress and the ageing endocrine system. *Nat. Rev. Endocrinol.* *9*, 228–240.
- Vranckx, R., Savu, L., Lambert, N., de Conchard, G. V, Grosse, R., Mourey, M.S., and Corman, B. (1995). Plasma proteins as biomarkers of the aging process. *Am. J. Physiol.* *268*, R536–48.
- de Vries, E.M., Fliers, E., and Boelen, A. (2015). The molecular basis of the non-thyroidal illness syndrome. *J. Endocrinol.* *225*, R67–R81.

- Vučić, V., Tepšić, J., Arsić, A., Popović, T., Debeljak-Martačić, J., and Glibetić, M. (2012). Fatty acid content of vegetable oils and assessment of their consumption in Serbia. *Acta Aliment.* *41*, 343–350.
- Wang, H.C., and Brumaghim, J.L. (2011). Polyphenol compounds as antioxidants for disease prevention: Reactive oxygen species scavenging, enzyme regulation, and metal chelation mechanisms in *E. coli* and human cells. In *Oxidative stress: Diagnostics, prevention, and therapy*, (ACS Symposium Series), pp. 99–175.
- Wang, J.F., Milosveski, V., Schramek, C., Fong, G.H., Becks, G.P., and Hill, D.J. (1998). Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function. *J. Endocrinol.* *157*, 5–12.
- Wang, M.J., Chao, P.D.L., Hou, Y.C., Hsiu, S.L., Wen, K.C., and Tsai, S.Y. (2006). Pharmacokinetics and conjugation metabolism of naringin and naringenin in rats after single dose and multiple dose administrations. *J. Food Drug Anal.* *14*, 247–253.
- Watson, R.R. (Ronald R., Preedy, V.R., and Zibadi, S. (2013). *Polyphenols in human health and disease*. Editors: Ronald Ross Watson Victor Preedy Sherma Zibadi. Academic Press.
- West, G.B., and Brown, J.H. (2005). The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization. *J. Exp. Biol.* *208*, 1575–1592.
- Weydert, C.J., and Cullen, J.J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat. Protoc.* *5*, 51–66.
- Wierzbicki, M., Chabowski, A., Zendzian-Piotrowska, M., and Gorski, J. (2009). Differential effects of in vivo PPAR alpha and gamma activation on fatty acid transport proteins expression and lipid content in rat liver. *J. Physiol. Pharmacol.* *60*, 99–106.
- Wilcox, L.J., Borradaile, N.M., de Dreu, L.E., and Huff, M.W. (2001). Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J. Lipid Res.* *42*, 725–734.
- Williams, G., and Brent, G. (1995). *Thyroid hormone response elements. Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations*. (New York: Raven Press).
- Wilson, C.G., Tran, J.L., Erion, D.M., Vera, N.B., Febbraio, M., and Weiss, E.J. (2016). Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-fed mice. *Endocrinology* *157*, 570–585.
- Wirth, E.K., Sheu, S.-Y., Chiu-Ugalde, J., Sapin, R., Klein, M.O., Mossbrugger, I., Quintanilla-Martinez, L., Hrabe de Angelis, M., Krude, H., Riebel, T., et al. (2011). Monocarboxylate transporter 8 deficiency: altered thyroid morphology and persistent high triiodothyronine/thyroxine ratio after thyroidectomy. *Eur. J. Endocrinol.* *165*, 555–561.
- Wissig, S.L. (1960). The anatomy of secretion in the follicular cells of the thyroid gland. I. The fine structure of the gland in the normal rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *7*, 419–432.
- Wolf, J., and Chaikoff, I.L. (1948). The inhibitory action of excessive iodide upon the synthesis of diiodothyrosine and of thyroxine in the thyroid gland of the normal rat. *Endocrinology* *43*, 174–179.

- Wollman, S. (1980). Structure of the thyroid gland. In: *The thyroid gland* (New York: Raven Press).
- Wu, J., Wang, C., Li, S., Li, S., Wang, W., Li, J., Chi, Y., Yang, H., Kong, X., Zhou, Y., et al. (2013). Thyroid hormone-responsive SPOT 14 homolog promotes hepatic lipogenesis, and its expression is regulated by Liver X receptor α through a sterol regulatory element-binding protein 1c-dependent mechanism in mice. *Hepatology* *58*, 617–628.
- Wu, Y., Xu, B., and Koenig, R.J. (2001). Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. *J. Biol. Chem.* *276*, 3929–3936.
- Xu, Z.-R., Li, J.-Y., Dong, X.-W., Tan, Z.-J., Wu, W.-Z., Xie, Q.-M., and Yang, Y.-M. (2015). Apple polyphenols decrease atherosclerosis and hepatic steatosis in ApoE^{-/-} mice through the ROS/MAPK/NF- κ B pathway. *Nutrients* *7*, 7085–7105.
- Yan, L.J. (2014). Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol.* *2*, 165–169.
- Yang, W., Burkhardt, B., Fischer, L., Beirow, M., Bork, N., Wönne, E.C., Wagner, C., Husen, B., Zeilinger, K., Liu, L., et al. (2015). Age-dependent changes of the antioxidant system in rat livers are accompanied by altered MAPK activation and a decline in motor signaling. *EXCLI J.* *14*, 1273–1290.
- Ye, L., Chan, F.L., Chen, S., and Leung, L.K. (2012). The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. *J. Nutr. Biochem.* *23*, 1230–1237.
- Yen, P.M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* *81*, 1097–1142.
- Yoshida, A., Hisatome, I., Taniguchi, S., Sasaki, N., Yamamoto, Y., Miake, J., Fukui, H., Shimizu, H., Okamura, T., Okura, T., et al. (2004). Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin. *Endocrinology* *145*, 4301–4308.
- Young, I.S., and Woodside, J. V (2001). Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* *54*, 176–186.
- Zhang, W., Yancey, P.G., Su, Y.R., Babaev, V.R., Zhang, Y., Fazio, S., and Linton, M.F. (2003). Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation* *108*, 2258–2263.
- Zhou, Y., Harrison, D.E., Love-Myers, K., Chen, Y., Grider, A., Wickwire, K., Burgess, J.R., Stochelski, M.A., and Pazdro, R. (2014). Genetic analysis of tissue glutathione concentrations and redox balance. *Free Radic. Biol. Med.* *71*, 157–164.
- Ziegler, D. V., Wiley, C.D., and Velarde, M.C. (2015). Mitochondrial effectors of cellular senescence: Beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell* *14*, 1–7.
- Zierau, O., Kretschmar, G., Möller, F., Weigt, C., and Vollmer, G. (2008). Time dependency of uterine effects of naringenin type phytoestrogens in vivo. *Mol. Cell. Endocrinol.* *294*, 92–99.
- Zirkin, B.R., and Tenover, J.L. (2012). Aging and declining testosterone: Past, present, and hopes for the future. *J. Androl.* *33*, 1111–1118.

Biografija

Marko Š. Miler je rođen 18.7.1986. godine u Vrbasu. Nakon završene osnovne škole u Kuli i gimnazije u Vrbasu, 2005. godine upisuje osnovne studije, smer Molekularna biologija, na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Studije je završio 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,05. Diplomski rad pod naslovom „Blokada androgenskog receptora remeti NO-cAMP signalni put u Lajdigovim ćelijama adultnih pacova“ uradio je na Katedri za fiziologiju životinja pomenutog Departmana i uspešno ga odbranio 8.10.2010. Naredne godine je upisao doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija. Počev od 2012. godine je, u okviru Projekta osnovnih istraživanja „Odgovor neuroendokrinog sistema pacova na odabrane biljne ekstrakte, fitoestrogene, steroidne i peptidne hormone“ (173009), angažovan na Odeljenju za citologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (IBISS), kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Iste godine se zaposlio na navedenom Odeljenju kojim rukovodi dr Verica Milošević, naučni savetnik IBISS, i stekao zvanje istraživač-pripravnik. Zvanje istraživač-saradnik stiće 2013. godine, u koje je reizabran 2016. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradio je pod mentorstvom dr Branke Šošić-Jurjević, naučnog savetnika IBISS, u okviru Projekta 173009, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Član je Srpskog društva fiziologa i Evropskog društva za endokrinologiju.

Marko Š. Miler je do sada objavio 9 radova u međunarodnim časopisima, od kojih 3 kao prvi autor i 20 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima.