

**UTICAJ SELENA I BLOKATORA DEJODINAZA NA TELESNU MASU
JUVENILNIH PACOVA*****THE INFLUENCE OF SELENIUM AND DEIODINASES BLOCKERS ON
JUVENILE RATS BODY WEIGHT**

Milanović Svetlana, Jovanović B. I., Bjelica Jelena, Joksimović S., Stefanović S.,
Magdalena Radović, Kirovski Danijela, Valčić Olivera, Gvozdić D.**

U okviru ogleda je ispitivan uticaj selena i blokatora dejodinaza na telesnu masu juvenilnih pacova tokom tri nedelje. Ogled je izveden na 64 pacova podeljenih u osam grupa od po 8 jedinki. Formirane su sledeće grupe: 1. Se+PTU-IA- (kontrolna grupa), 2. Se+PTU+IA+, 3. Se+PTU+IA-, 4. Se+PTU-IA+, 5. Se-PTU-IA-, 6. Se-PTU+IA+, 7. Se-PTU+IA- i 8. Se-PTU-IA+. Grupe sa oznakom (Se+) su bile sele-nadekvatne i dobijale su hranu koja je sadržala 0,334 mg Se/kg hrane. Grupe sa oznakom (Se-) su bile selendeficitne i dobijale su 0,031 mg mg Se/kg hrane. Kao blokatori dejodinaza su korišćeni propiltiouracil (PTU+) u dozi od 150 mg/L vode za piće i jopanoična kiselina (IA+) u dozi od 6 mg/100g t.m. intraperitonealno. Telesna masa oglednih pa-cova je merena svakih sedam dana. Nakon tri nedelje tretmana uzeti su uzorci krvi životinja iz svih oglednih grupa i određivani su sledeći parametri: koncentracija selena u punoj krvi, tiroksin (T4), trijodtironin (T3) i tireostimulirajući hormon (TSH) u krvnoj plazmi. Analiza je pokazala da su jedinke iz grupe tretiranih sa PTU imale nižu telesnu masu u odnosu na kontrolnu, kao i nižu koncentraciju T3 i T4 u plazmi. Selendeficitni pacovi su nakon tri nedelje imali nižu prosečnu telesnu masu u odnosu na selenadekvatne, ali nisu uočene razlike u koncen-

* Rad primljen za štampu 14. 02. 2013. godine.

** Dr sci. vet. med. Svetlana Milanović, asistent, dr sci. vet. med. Ivan B. Jovanović, red. profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Jelena Bjelica, dr vet. med., Agencija za lekove i medicinska sredstva, Srbija; mr sci. pharm. Srđan Joksimović, mr pharm, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Srđan Stefanović, dr vet. med., Institut za tehnologiju i higijenu mesa, Beograd, Srbija; Magdalena Radović, istraživač saradnik, Institut za nuklearne nauke Vinča, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr sci. vet. med. Danijela Kirovski, vanr. profesor, dr sci. vet. med. Olivera Valčić, vanr. profesor, dr sci. vet. med. Dragan Gvozdić, red. profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

traciji tireoidnih hormona. Najniža prosečna telesna masa zabeležena je kod selendeficitnih grupa pacova tretiranih sa PTU.

Ključne reči: selen, propiltiouracil, jopanoična kiselina, telesna masa, pacovi

Uvod / Introduction

Selen je esencijalni mikroelement sa mnogostrukim i vrlo važnim ulogama u organizmu. Selen ulazi u sastav antioksidativnih enzima, kao što su glutation peroksidaza i tioredoksin reduktaza, prevenira pojavu kancera (Combs i Lu, 2001) i kardiovaskularnih bolesti (Mihajlović i sar., 2003), a takođe je neophodan za optimalno funkcionisanje endokrinog i imunskog sistema (Arthur i sar., 2003). Za razliku od ostalih mikroelemenata koji figuriraju kao kofaktori pojedinih enzima, fiziološke uloge selena su direktno povezane sa funkcijama proteina u čiji sastav se kotranslatorno ugrađuje putem netipične aminokiseline selenocisteina. Do sada je otkriveno oko 30 selenoproteina, a samo za neke od njih je poznata fiziološka uloga. Jodotironin dejodinaze (ID) su takođe selenoenzimi, odgovorni za aktivaciju i deaktivaciju tireoidnih hormona (Berry i sar., 1991). Identifikovano je 3 tipa dejodinaza. Tip 1 (ID1) vrši aktivaciju prohormona T4 u aktivni T3, takođe, inaktivira T4 u reverzni T3 (rT3), a osetljiva je na inhibiciju sa propiltiouracilom (PTU). Dejodinaza tipa 2 (ID2) aktivira T4 u T3, a takođe prevodi reverzni T3 u 3,3' T2 i osetljiva je na dejstvo jopanoične kiseline (IA) (Germain DL, 1988). Njena aktivnost je pre svega vezana za intracelularnu konverziju T4 u T3. Dejodinaza tipa 3 (ID3) katalizuje deaktivaciju tireoidnih hormona pri čemu od T4 nastaje neaktivni rT3, odnosno od T3 nastaje 3,3'-T2.

Tireoidni hormoni utiču na mnoge metaboličke procese u organizmu. Oni povećavaju unošenje i potrošnju kiseonika, što povećava nivo oksidacionih procesa čija je posledica sinteza ATP-a i oslobađanje toplote. Dalje, tireoidni hormoni povećavaju promet ATP te ubrzavaju gotovo sve metaboličke procese vezane za proizvodnju i potrošnju ATP-a. Za razliku od odraslih organizama, kod kojih je smanjen nivo tireoidnih hormona vezan za povećanje telesne mase, kod mladih jedinki hipotireoidizam ima za posledicu zaostajanje u rastu gotovo kod svih kičmenjaka. Kod sisara je ovo rezultat uticaja T3 i T4 na sekreciju hormona rasta (STH) iz prednjeg režnja hipofize, kao i narušenog dejstva STH u perifernim tkivima (Snyder, 1996). Smanjena koncentracija T3 i T4 dovodi do smanjenja transkripcije iRNK za STH, a posledično i smanjene koncentracije STH u serumu (Samuels i sar., 1989). Hormon rasta, dalje, preko insulini sličnog faktora rasta (IGF-*insulin-like growth factor*) utiče na anaboličke i mitogene procese u ćelijama. Međutim, uticaj tireoidnih hormona nije isključivo posredan preko hormona rasta. Uočena je smanjena koncentracija IGF i nakon dodavanja STH, te je zaključeno da tireoidni hormoni imaju i direktan uticaj na sintezu IGF-1 (Nanto-Salonen, 1993).

Deficit selena ima kompleksan uticaj na sintezu tireoidnih hormona. Tkiva različito reaguju na nedostatak ovog elementa. Tako mozak, hipofiza, štitasta žlezda, nadbubreg i gonade zadržavaju selen i pored smanjenog unosa, dok u krvnoj plazmi, jetri, skeletnim mišićima i srcu njegova količina dramatično opada (Bates i sar., 2000). Meinhold i sar. (1992) su uočili da je prilikom nedostatka selena aktivnost ID1 u štitastoj žlezdi očuvana, a da u jetri opada. Kod pacova je deficit selena povezan sa porastom koncentracije T4, ali malom promenom koncentracije T3 u serumu, pri čemu je koncentracija TSH nepromenjena (Meinhold i sar., 1993; Veronikis i sar., 1996). Takođe, opada aktivnost ID1 u bubrezima i jetri (DePalo i sar., 1994).

Smatra se da deficit selena utiče na rast jedinki tek u F2 generaciji, ali mehanizam nije razjašnjen. Neki autori smatraju da bi uticaj selena na rast mogao biti preko tireoidnih hormona ili direktno na hormon rasta ili IGF. Cilj ovog rada bio je da ispitamo uticaj deficita selena sa i bez primene blokatora dejodinaza na porast telesne mase juvenilnih pacova u periodu od 21-42 dana starosti, kada je porast telesne mase najizraženiji.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

U cilju ispitivanja uticaja selena i blokatora dejodinaza na telesnu masu juvenilnih pacova, korišćeni su Wistar pacovi stari 21 dan, prosečne telesne mase $48,6 \pm 7,8$ g, poreklom od "Charles-River", Mađarska. Ispitivanja su izvedena na jedinkama muškog pola. Hranjenje i napajanje su bili *ad libitum*.

Ogled je izveden na ukupno 64 pacova podeljenih u osam grupa od po 8 jedinki. Formirane su sledeće ogleadne grupe:

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

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

Grupe sa oznakom Se⁺ (1, 2, 3 i 4) su dobijale hranu za pacove koja je sadržala 0,334 mg selena po kilogramu hrane, a grupe sa oznakom Se⁻ (5, 6, 7 i 8) su hranjene selendeficitnom hranom (0,031 mg selena/kg hrane). Grupe 2, 3, 6 i 7 (PTU⁺) su preko vode za piće dobijale propiltiouracil (PTU). Koncentracija PTU u vodi za piće je bila 150 mg/l. Grupe sa oznakom PTU⁻ su napajane normalnom vodom za piće. Jedinkama iz grupa 2, 4, 6 i 8 (IA⁺) je svakih sedam dana intraperitonealno aplikovana jopanoična kiselina u dozi 6 mg/100 g TM.

Treće nedelje oglada jedinke su uvedene u etarsku anesteziju, a zatim je kardijalnom punkcijom uzeto 3-5 ml krvi. Deo krvi je korišćen za određivanje kon-

centracije selena, a deo za dobijanje plazme nakon centrifugovanja u epruvetama na 3000 obrtaja/min tokom 20 minuta. Kao antikoagulaciono sredstvo je korišćen heparin (15 IJ heparina po ml krvi). Iz plazme je određivana koncentracija hormona T3 i T4. Za određivanje koncentracije T3 i T4 korišćeni su komercijalni RIA kitovi (INEP, Zemun). Koncentracija selena u punoj krvi određivana je hidridnom tehnikom na atomskom absorpcionom spektrofotometru. Statistička obrada podataka obavljena je korišćenjem programa MS Excel 2007 i GraphPadPrism5.

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Merenje telesne mase oglednih životinja vršeno je svakih sedam dana od ulaska jedinki u ogled. Na početku eksperimenta (0 dan) izmerena telesna masa svih oglednih životinja je u proseku iznosila 48,6±2,3 g, a među grupama nije postojala statistički značajna razlika (tabela 1).

Tabela 1. Prosečna telesna masa (Xsr±SD) pacova tokom 3 nedelje ogleda (g)
Table 1. Average body weight (Xsr±SD) of rats during 3 experimental weeks (g)

	Grupa / Group	Nedelja / Week			
		0	1	2	3
Se+	PTU- IA-	46,5±10,1	78,7±14,4	120,9±16,5	169,0±22,7
	PTU+ IA+	49,2±8,2	81,9±11,3	113,9±13,0	156,3±12,2
	PTU+ IA-	47,3±11,9	79,2±8,2	117,4±8,9	148,0±12,3
	PTU- IA+	46,2±7,1	78,8±11,0	125,6±14,8	178,7±12,2
Se-	PTU- IA-	51,3±5,1	75,1±7,8	109,7±12,2	152,2±18,9
	PTU+ IA+	48,4±2,4	67,2±4,3	92,3±7,2 ^b	111,1±9,9 ^c
	PTU+ IA-	47,4±7,7	66,8±9,3	90,9±9,9 ^c	111,1±15,1 ^c
	PTU- IA+	59,6±5,2	73,3±6,8	106,4±9,8	149,8±10,1

a-p<0,05 b-p<0,01 c-p<0,001

Telesna masa selendeficitnih jedinki (Se-PTU-IA-) tokom ogleda bila je nešto niža u odnosu na kontrolu, ali nije bilo statistički značajne razlike, što je u skladu sa navodima Barnes-a i sar. (2009). Nakon dve nedelje ogleda, obe selendeficitne grupe tretirane sa PTU (Se-PTU+IA+ i Se-PTU+IA-) su imale za približno 25% nižu telesnu masu u odnosu na kontrolnu grupu, što je bilo na nivou značajnosti p<0,001. Na kraju ogleda, selendeficitne jedinke tretirane sa PTU su imale za 34% manju telesnu masu od jedinki kontrolne grupe (p<0,001). U ovim grupama je zabeležena hipotireozna (tabela 2) sa izrazito niskim koncentracijama T4 i T3 u krvi i visokim koncentracijama TSH. Nizak nivo T4 u cirkulaciji posledica je dejstva PTU na tireocitnu peroksidazu koja oksiduje jod (I⁻¹→I⁰) i ugrađuje ga u tirozil ostatke tireoglobulina (Engler i sar., 1983). Pored toga, poznato je da PTU blokira dejodinazu 1 i smanjuje koncentraciju T3. Kako tireoidni hormoni imaju veliki uticaj na metaboličke procese u toku rasta direktno ili indirektno preko hormona rasta ili IGF-a, zaostajanje u rastu jedinki tretiranih sa PTU je bilo očekivano.

Ostaje nejasno zašto selenadekvatne jedinice tretirane sa PTU kod kojih su takođe zabeležene vrlo niske koncentracije tireoidnih hormona, imaju značajno višu prosečnu telesnu masu u odnosu na selendeficitne jedinice tretirane sa PTU. Ovaj nalaz mogao bi ukazati na uticaj selena na sintezu hormona rasta ili IGF faktora.

Tabela 2. Koncentracija selena ($\mu\text{g/L}$), T4 (nmol/L), T3 (nmol/L) i TSH (ng/mL) u krvi ispitivanih jedinki nakon 3 nedelje tretmana
Table 2. Selenium concentration ($\mu\text{g/L}$), T4 (nmol/L), T3 (nmol/L) and TSH (ng/mL) in the tested animals blood after 3 weeks' treatment

	Grupa / Group	Se ($\mu\text{g/L}$)	T4 (nmol/L)	T3 (nmol/L)	TSH (ng/mL)
Se ⁺	PTU ⁻ IA ⁻	364,8 \pm 98,1	85,9 \pm 23,7	2,2 \pm 0,3	2,98 \pm 0,83
	PTU ⁺ IA ⁺	269,5 \pm 85,1	33,2 \pm 7,0 ^c	0,9 \pm 0,6 ^c	71,19 \pm 9,28 ^c
	PTU ⁺ IA ⁻	477,7 \pm 105,4	27,8 \pm 6,1 ^c	1,2 \pm 0,4 ^c	87,83 \pm 10,34 ^c
	PTU ⁻ IA ⁺	485,5 \pm 105,8	93,3 \pm 12,5	2,3 \pm 0,2	6,02 \pm 2,78 ^a
Se ⁻	PTU ⁻ IA ⁻	58,2 \pm 8,3 ^c	85,7 \pm 11,1	1,9 \pm 0,3	6,57 \pm 3,03 ^a
	PTU ⁺ IA ⁺	67,2 \pm 4,5 ^c	24,8 \pm 11,6 ^c	1,0 \pm 0,6 ^c	83,03 \pm 12,71 ^c
	PTU ⁺ IA ⁻	66,6 \pm 16,6 ^c	18,5 \pm 8,7 ^c	1,6 \pm 0,4 ^a	85,43 \pm 15,64 ^c
	PTU ⁻ IA ⁺	63,5 \pm 13,9 ^c	94,5 \pm 15,9	2,2 \pm 0,3	4,54 \pm 2,63

a-p<0,05 b-p<0,01 c-p<0,001

Zaključak / Conclusion

Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da hipotireoza udružena sa deficitom selena izaziva usporeniji rast jedinki nego kada je u pitanju samo hipotireoza ili samo deficit selena.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGMENT:

Rad je realizovan iz projekta TR31050 i TR31003 Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije.

The work is realised under the project TR31050 and TR31003 of the Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia

Literatura / References

1. Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ. Selenium in the immune system. J Nutr 2003; 133: 1457S-9S.
2. Barnes KM, Evenson JK, Raines AM, Sunde RA. Transcript analysis of the selenoproteome indicates that dietary selenium requirements of rats based on selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity¹⁻³. J Nutr 2009; 139: 199-206.
3. Bates JM, Spate VL, Morris JS, St. Germain DL, Galton VA. Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. Endocrinology 2000; 141: 2490-500.
4. Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. Nature 1991; 353: 273-6.

5. Combs Lu. Selenium as a cancer preventative agent, In Selenium, Its Molecular Biology and Role in Human Health. Ed DL Hatfield. Boston Kluwer Academic Publishers, 2001, 205-19.
6. DePalo D, Kinlaw WB, Zhao C, Engelberg-Kulka H, St. Germain DL. Effect of selenium deficiency on type I 5'-deiodinase. J Biol Chem 1994; 269: 16223-8.
7. Engler H, Taugo A, Luthy C, Dorris MI. Reversible and irreversible inhibition of thyroid peroxidase-catalyzed iodination by thioureylene drugs. Endocrinology 1983; 112: 86.
8. Germain DL. The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thiol-disulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase. Endocrinology 1988a; 122: 1860-8.
9. Meinhold H, Campos-Barros A, Behne D. Effects of selenium and iodine deficiency on iodothyronine deiodinases in brain, thyroid and peripheral tissue. Acta Med Austriaca 1992; 19: 8-12.
10. Meinhold H, Campos-Barros A, Walzog B, Kohler R, Muller F, Behne D. Effects of selenium and iodine deficiency on type I, type II and type III iodothyronine deiodinases and circulating thyroid hormones in the rat. Exp Clin Endocrinol 1993; 101: 87-93.
11. Mihajlović M, Vasiljević Z, Šobajić S, Jovanović I, Pešut O, Matić G. Antioxidant status of patients with acute myocardial infarction. Trace Element and Electrolytes 2003; 20: 5-7.
12. Nanto-Salonen K, Muller HL, Hoffman AR, Vu TH, Rosenfeld RG. Mechanisms of thyroid hormone action on the insulin-like growth factor system: all thyroid hormone effects are not growth hormone mediated. Endocrinology 132 1993; 781-8.
13. Samuels HH, Casanova J, Copp RP, Janocko L, Raaka BM, Sahnoun H, Yaffe BM. Thyroid hormone receptors and action: the 5'-flanking region of the rat growth hormone gene can mediate regulated gene expression. Endocr Res 1989; 15(4): 495-545.
14. Snyder PJ. The pituitary in hypothyroidism. In Werner and Ingbars. The Thyroid. 7th edition (eds L. E. Braverman & R. D. Utiger). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, 836-40.
15. Veronikis IE, Braverman LE, Alex S, Fang SL, Norvell B, Emerson CH. Comparison of the effects of propylthiouracil and selenium deficiency on T₃ production in the rat. Endocrinology 1996; 137: 2580-5.

ENGLISH

THE INFLUENCE OF SELENIUM AND DEIODINASES BLOCKERS ON JUVENILE RATS BODY WEIGHT

Milanović Svetlana, Jovanović B. I., Bjelica Jelena, Joksimović S., Stefanović S., Magdalena Radović, Kirovski Danijela, Valčić Olivera, Gvozdić D.

In this work there was investigated the influence of selenium and deiodinases blockers on juvenile rats body weight during three months. The experiment was carried out on 64 rats divided into eight groups with eight individual animals per group. Following groups were formed: 1. Se+PTU-IA- (control group), 2. Se+PTU+IA+, 3. Se+PTU+IA-, 4. Se+PTU-IA+, 5. Se-PTU-IA-, 6. Se-PTU+IA+, 7. Se-PTU+IA- and 8. Se-PTU-IA+. The groups labeled (Se+) were selenium adequate and they were fed with food that contained 0.334 mg Se/kg. The groups labeled (Se-) were selenium deficient and obtained food with 0.031 mg Se/kg. As deiodinases blockers there were used propylthiouracil (PTU+) in a dose of 150 mg/L of drinking water and iopanoic acid (IA+) in a dose of 6 mg/100 g TM intraperitoneally. Body weight of experimental rats was measured every seven days. After three weeks of treatment there were taken blood samples of animals from all experimental groups and

following parameters were determined: selenium concentration in blood, thyroxine (T4), triiodothyronine (T3) and thyroidstimulating hormone (TSH) in blood plasma. Analysis of the samples showed that the animals from the groups treated with PTU had lower body weight in regard to the control group, as well as lower concentration of T3 and T4 in plasma. Selenium deficient rats had lower average body weight compared to the selenium adequate ones after three weeks, but there were no differences in thyroid hormones concentration. The lowest average body weight was noticed in selenium deficient rats groups treated with PTU.

Key words: selenium, propylthiouracil, iopanoic acid, body weight, rats

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНА И БЛОКАТОРОВ ДЕЙОДИНАЗЫ НА ВЕС ЮВЕНИЛЬНЫХ КРЫС

Миланович Светлана, Йованович Б. И., Бъелица Елена, Йоксимович С., Стефанович С., Радович Магдалена, Кировски Даниела, Валчич Оливера, Гвоздич Д.

В эксперименте исследовали влияние селена и блокаторов дейодиназы на вес ювенильных крыс в течение 3 недели. Эксперимент проводили на 64 крысы, которые были разделены на 8 групп по 8 животных. Сформировали следующие группы: 1. Se+PTU-IA- (контрольная группа), 2. Se+PTU+IA+, 3. Se+PTU+IA-, Se+PTU-IA+, 5. Se-PTU-IA-, 6. Se-PTU+IA, 7. Se-PTU+IA- и 8. Se-PTU-IA+. Группы со Se+ были селенадекватными и получали пищу, содержащую 0,334 мг Se/кг корма. Группы со Se- были селендефицитными и получали 0,031 мг Se/кг корма. Блокаторами дейодиназы используются пропилтиурацил, PTU +, в дозе 150 мг/л питьевой воды и йопаноическая кислота + IA в дозе 6mg/100g ТМ внутрибрюшинно.

Вес подопытных крыс измеряли через семь дней. После 3 недели лечения были взяты образцы крови всех крыс из экспериментальных групп и определены следующие параметры: концентрация селена в цельной крови, тироксина (Т4), трийодтиронина (Т3) и тиреостимулирующего гормона (ТСХ) в плазме крови. Анализ показал, что образцы из группы, обработанной PTU имели более низкий вес тела по сравнению с контрольной группой и концентрацию Т3 и Т4. Селендефицитные крысы после 3 недели, имели более низкий средний вес тела по сравнению с селенадекватной, но различия не были обнаружены в концентрации гормонов щитовидной железы. Самый низкий средний вес тела наблюдался в селендефицитной группе крыс, получавших PTU.