

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

Petar A Dodovski

**HORMONALNI I METABOLIČKI
STATUS TELADI NEONATALNOG
PERIODA POREKLOM OD
PRIMAPARNIH MAJKI TRETIRANIH SA
PROPILTIOURACILOM TOKOM
GRAVIDITETA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Petar A Dodovski

**HORMONAL AND METABOLIC
STATUS OF NEONATAL CALVES
BORN BY PRIMIPAROUS DAMS
TREATED WITH
PROPYLTHIOURACIL DURING
PREGNANCY**

PhD Thesis

Belgrade, 2015.

Mentori

Prof. dr Danijela Kirovski, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Ožbalt Podpečan, docent

Veterinarski fakultet Univerziteta u Ljubljani

Članovi Komisije

Prof. dr Milutin Đorđević, vandredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Ivan Vujanac, docent

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Đorđe Savić, docent

Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Banjaluci

Datum odbrane doktorske disertacije

.....

Zahvaljujem se Mentoru, prof. dr Danijeli Kirovski, na ogromnom strpljenju i razumijevanju koje je imala za mene tokom rada na ovom istraživanju.

Svim članovima Komisije, zahvaljujem se na brojnim i korisnim sugestijama, koje su mi pomogle u radu i doprinijele da ova disertacija bude bolja.

HORMONALNI I METABOLIČKI STATUS TELADI TOKOM NEONATALNOG PERIODA POREKLOM OD PRIMAPARNIH MAJKI TRETIRANIH SA PROPILTIOURACILOM TOKOM GRAVIDITETA

REZIME

Cilj ove doktorske je bio da se ispita efekat hipotireoze majke indukovane tokom kasnog graviditeta na endokrini i metabolički status novorođenih teladi tokom prvih sedam dana neonatalnog života. Hipotireoza majke je indukovana davanjem PTU u dozi od 4mg/kg telesne mase tokom poslednjih 20 dana graviditeta. Nakon rađanje, telad koja potiču od majki tretiranih sa PTU (n=10) je svrstano u oglednu grupu, dok je 10 teadi koja su poticala od majki koje nisu tretirane sa PTU svrstano u kontrolnu grupu. Sva telad su bila odmah po rođenju odvojena od majki i napajana kolostrumu i mlekom tokom ispitivanog perioda. Svakodnevno, tokom prvih sedam dana neonatalnog života teladima je uzimana krv punkcijom *v. jugularis*. Odmah nakon rođenja teladi uzimani su uzorci tkiva placente majke i tkiva tireoidee teladi. Koncentracija tireoidnih hormona i koncentracija TSH ispitivana je u svim uzetim uzorcima krvi. U uzorcima krvi uzetih 0., 1., 2., 3., 4. i 7. dana nakon rođenja određene su koncentracije glukoze, insulina, kortizola, IGF-I i relativna zastupljenost IGFBP-2 i IGFBP-3. U svim uzorcima krvi uzetih tokom sedam dana ispitivanja, ispitane su koncentracije ukupnih proteina, albumina i globulina, kao i koncentracije holesterola i triglicerida. U uzorcima tkiva placente majki i tkiva tireoidee teladi, ispitivana je ekspresija iRNK za pojedine tipove dejodinaze, dok su u uzorcima tkiva tireoidee određivane i histološke promene.

Telad ogledne grupe rađala su se sa značajno nižim koncentracijama tireoidnih hormona (T_3 i T_4) i značajno višim koncentracijama TSH u odnosu na telad kontrolne grupe. Ova razlika je bila značajna tokom prva dva dana neonatalnog života. Počevši od 3. dana, koncentracije tireoidnih hormona su se kod ogledne grupe povećavale, a TSH snižavale, tako da su koncentracije tireoidnih hormona u periodu od 4. do 6. dana bile značajno više a koncentracije TSH značajno niže kod ogledne nego kod kontrolne grupe. Koncentracije insulina su u momentu rođenja bile značajno niže kod teladi ogledne grupe u odnosu na telad kontrolne grupe. Vrednosti insulinemije su se kod

ogledne grupe povećavale tako da je vrednost bila veća nego kod kontrolne grupe već 4. dana, iako ne statistički značajno. Koncentracije glukoze su kod ogledne grupe bile niže tokom celog perioda ispitivanja. Koncentracije IGF-I i relativna zastupljenost IGFBP 2 i IGFBP-3 su kod ogledne grupe takođe bile niže u odnosu na kontrolnu grupu u svim periodima ispitivanja. Značajno više koncentracije kortizola utvrđene su kod ogledne grupe u odnosu na kontrolnu grupu u svim periodima merenja. Koncentracije ukupnih proteina kod teladi ogledne grupe se u prva 2 dana neonatalnog života nije značajno razlikovala u odnosu na vrednosti kod kontrolne grupe. Nakon 3. dana koncentracije kod ogledne grupe su bile značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu. Sličan rezultat je dobijen merenjem koncentracija albumina s tim da su značajno niže koncentracije albumina kod ogledne grupe utvrđene jedino 5. i 6. dana neonatalnog života. Koncentracije globulina kod ogledne grupe su bile značajno niže počevši od prvog pa do 7. dana neonatalnog života. Kod teladi ogledne grupe koncentracije triglicerida su bile značajno veće u svim perioda ispitivanja, dok je koncentracija holesterola bila niža u odnosu na kontrolnu grupu. U uzorcima tkiva placente majki oglednih teladi ustanovljena je povećana ekspresija iRNK za sva tri tipa ispitivanih dejodinaza u odnosu na majke kontrolne grupe teladi. U uzorcima tkiva tireoidee teladi ustanovljena je ekspresija iRNK DIO1 i posebno DIO2, dok nije ustanovljena ekspresija iRNK za DIO3. Histološke analize uzoraka tkiva tireoidee teladi ogledne grupe su pokazale hiperplastične promene žlezde uz jako povećanje broja folikula, dominaciju mikrofolikula malog dijametra lumena. Utvrđeni su i neaktivni makrofolikuli sa slabo izraženim vakuolizacijama koloida ili bez koloida.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da hipotireoidno stanje majke tokom poslednje faze graviditeta utiče na status tireoidne osovine novorođenih životinja, a time i na promene u ostalim endokrinim i metaboličkim parametrima, što ukazuje na značaj tireoidne osovine na rast i razvoj teladi kao i sazrevanje mehanizama adaptacije novorođenčadi tokom ranog neonatalnog perioda života.

Ključne riječi: neonatalna telad, hipotireoza, insulin, kortizol, IGF.

Naučna oblast: Morfologija i fiziologija životinja

Uža naučna oblast: Fiziologija i metabolizam neonatalne teladi

UDK broj: 612.43:636.234(043.3)

HORMONAL AND METABOLIC STATUS OF NEONATAL CALVES BORN BY PRIMIPAROUS DAMS TREATED WITH PROPYLTHIOURACIL DURING PREGNANCY

SUMMARY

The aim of this PhD thesis was to examine the effect of induced hypothyroidism in Holstein heifers in the latest stage of pregnancy on endocrine and metabolic status of newborn calves during the first seven days of neonatal life. The study was conducted by inducing hypothyroid state in the dams by oral treatment with 4mg PTU/kg body weight, during a period of 20 days prior to expected calving. After birth, calves originating from dams treated with PTU (n = 10) were classified as experimental group, while 10 calves that originated from dams not treated with PTU were classified as the control group. All calves were separated immediately after birth from their dams and fed colostrum and milk during the test period. During this period, calves body weight was also determined. Blood samples were taken daily by puncture of v. jugularis from each calf for the first seven days of life. Immediately after parturition placental samples and calves thyroid tissue samples were obtained. Concentrations of thyroid hormones and TSH were determined in all blood samples. Concentration of IGF-I and relative presence of IGFBP-2 and IGFBP-3 were determined in samples taken on days 1, 2, 3, 4 and 7 after birth. Concentrations of glucose, insulin and cortisol were determined in samples taken on days 1, 2, 3, 4, 7. Concentrations of total protein, albumin, globulin, triglyceride and cholesterol were determined in samples obtained during the all seven days of study period. On placental and thyroid tissue samples, expression of mRNA for DIO1, DIO2 and DIO3 were determined. Determination of histological changes was done on thyroid tissue samples taken from calves with established macroscopic changes on thyroid gland.

Calves in experimental group were born with significantly lower thyroid hormone concentrations and significantly higher TSH concentrations compared to control group. Hypothyroid state was significant within the first two days after birth. After day 3, concentrations of thyroid hormones increased, so in the period of days 4, 5

and 6 they were higher compared to the control group, while the TSH concentrations decreased until day 4 after which the TSH concentrations were lower compared to the control group. During the first two days, concentrations of insulin were significantly low but increased by day 4 when concentrations of insulin were higher compared to control group even though the differences with control group were not significant. The concentrations of glucose were lower throughout the study period. Concentration of IGF-I and relative presence of IGFBP-2 and IGFBP-3 in experimental group were lower compared to the control group throughout the study period. Significantly high concentrations of cortisol were determined in experimental group in all periods of measurement. Concentrations of total protein in experimental group were not different in experimental group compared to the control group during the first two days. After the third day, concentrations of total protein were significantly lower compared to control group. Similar results were found by measuring concentrations of albumin, thus significantly lower concentrations were determined on day 5 and day 6. Starting from the first day after birth until the day 7, concentrations of globulin were significantly lower compared to control group. Concentrations of triglycerides were significantly higher in experimental calves but cholesterol concentrations were lower. Enhanced expression of iRNA for all three types of deiodinases were detected in placental tissue samples compared to the control group, even though the differences were of minor significance for DIO1 than the differences in DIO2 and DIO3. The expression of iRNA was detected with significance for DIO2 and with minor significance for DIO1, but no expression of iRNA for DIO3 was detected on calf thyroid tissue samples. Histological analysis of calf thyroid tissue samples in experimental group showed hyperplastic changes with increase of number of follicles with predominance of microfollicles with small lumen diameter. Numbers of relatively inactive macrofollicles were detected with sparse vacuolization of colloid, with no colloid or decreased colloid in their lumen.

Based on these results it can be concluded that the hypothyroid condition in dams in the final stage of pregnancy influences the thyroid status in newborns and thus changes the other endocrine and metabolic parameters, which indicates the importance of thyroid axis on growth and development in infants and adaptation mechanism in early neonatal period.

Key words: neonatal calves, hypothyroidism, insulin, kortisol, IGF.

Scientific field: Animal morphology and physiology

Field of academic expertise: Physiology and metabolism of neonatal calves

UDK number: 612.43:636.234(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Tireoidna osovina i regulacija njene aktivnosti	3
2.2. Tireotropin oslobađajući hormon.....	8
2.2.1. Fiziološka uloga.....	11
2.3. Tireostimulirajući hormon	12
2.3.1. Struktura, sinteza i sekrecija.....	13
2.3.2. Fiziološka uloga.....	19
2.4. Trijodtironin i tiroksin.....	24
2.4.1. Struktura, sinteza i sekrecija.....	24
2.4.2. Fiziološka uloga.....	30
2.5. Specifičnosti tireoidne osovine teladi tokom neonatalnog perioda života.....	42
2.6. Uticaj aktivnosti tireoidne osovine na endokrini i metabolički status teladi .	45
2.6.1. Uticaj aktivnosti tireoidne osovine na IGF system.....	45
2.6.2. Uticaj tireoidne osovine na koncentracije insulina i glukoze.....	52
2.6.3. Tireoidna osovina i kortizol.....	55
2.6.4. Tireoidna osovina i leptin.....	57
2.6.5. Koncentracija ukupnih proteina, globulini i tireoidna osovina	58
2.6.6. Aktivnost tireoidne osovine i njen uticaj na koncentraciju lipida u krvi teladi	60
2.7. Smanjena funkcija tireoidee – hipotireoza.....	61
2.7.1. Indukcija hipotireoze	67
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	72
5. MATERIJAL I METODE RADA	73
5.1. Ogleadne životinje	73
5.2. Uzimanje uzoraka biološkog materijala.....	74
5.2.1. Uzimanje uzoraka krvi.....	74
5.2.2. Uzimanje uzoraka placente.....	74

5.2.3.	Uzimanje uzoraka tkiva tireoidee	74
5.3.	Analize uzoraka biološkog materijala.....	75
5.3.1.	Analize uzoraka krvi.....	75
5.3.2.	Analiza uzoraka tkiva	77
5.4.	Statistička obrada podataka.....	79
6.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	80
6.1.	Koncentracija trijodtironina (T ₃) u krvnom serumu teladi.....	80
6.2.	Koncentracija tiroksina (T ₄) u krvnom serumu teladi.....	83
6.3.	Koncentracija tireostimulirajućeg hormona (TSH) u krvnom serumu teladi	86
6.4.	Koncentracija insulina u krvnom serumu teladi	89
6.5.	Koncentracija glukoze u krvi teladi	92
6.6.	Koncentracija kortizola u krvnom serumu teladi.....	95
6.7.	Koncentracija IGF-I u krvnom serumu teladi	98
6.8.	Relativna zastupljenost IGF-vezujućih proteina u krvnom serumu teladi ...	101
6.9.	Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu teladi	106
6.10.	Koncentracija globulina (g/L) u krvnom serumu teladi.....	109
6.11.	Koncentracija albumina (g/L) u krvnom serumu teladi	112
6.12.	Koncentracija triglicerida (mmol/L) u krvnom serumu teladi	115
6.13.	Koncentracija holesterola (mmol/L) u krvnom serumu teladi.....	118
6.14.	Ekspresija iRNK za pojedine tipove dejodinaza u uzorcima tkiva placente i tkiva tireoidee teladi.....	121
6.15.	Histološka analiza odabranih uzoraka tkiva tireoidee teladi.....	124
7.	Diskusija	126
7.1.	Uticaj prenatalnog tretmana sa PTU na tireoidni status teladi.....	127
7.2.	Uticaj prenatalnog tretmana sa PTU na glikemiju i hormone uključene u regulaciju glikemije (insulin i kortizol)	135
7.3.	Uticaj prenatalnog tretmana sa PTU na IGF sistem teladi.....	140
7.4.	Uticaj prenatalnog tretmana sa PTU na proteinski status neonatalne teladi	147
7.5.	Uticaj prenatalnog tretmana sa PTU na lipidni status neonatalne teladi.....	151
8.	ZAKLJUČCI	155
9.	LITERATURA.....	157

Popis korišćenih skraćenica

HPT	hypothalamic-pituitary-thyroid
TSH	tireostimulirajući hormon
TSH-R	receptor za tireostimulirajući hormon
TRH	tireotropin oslobađajući hormon
TRH-R 1,2	receptor za tireotropin oslobađajući hormon
CSF	cerebrospinalna tečnost
MCT	monokarboksilatni transporteri
OTAP	organske transportne polipeptide
MCR4	melanokortin 4 receptor
α-MSH	α melanocyte-stimulating hormone
PRF	prolaktin oslobađajući faktor
NPY	neuropeptid Y
T4	3,3',5,5'- tetrajodtironin, tiroksin
T3	3,3',5 - trijodtironin, trijodtironin
rT3	3,3',5' - trijodtironin, reverzni trijodtironin
MIT	Monojodtirozin
DIT	Dijodtirozin
DIO 1, 2, 3	dejodinaza tipa I, II, III
PVN	paraventrikularni nukleus
FS	folikulo-stelatne ćelije
MCT8	transporter za tiroidne hormone
IGF-I	insulinu sličan faktor rasta I
IGFBP 1-6	protein nosač IGF 1-6
VLDL	lipoproteini veoma male gustine
JAK	Janus tyrosine kinase
MTU	6-metil-2-tiouracil, metiltiouracil
PTU	6-propil-2-metil-tiouracil, propiltiouracil
NIS	Na/J simporter
PCR	lančana reakcija polimeraze
AU	Arbitrary Unit
GRE	glucocorticoid response element

ARC	Arkuatno jedro hipotalamusa
DMH	dorzomedijano jedro hipotalamusa
GPCR	G protein-coupled receptor
GH	hormon rasta
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
hCG	humani gonadotropinom
FSH	folikulostimulirajući hormon
LH	luteinizirajući hormon
AGRP	agouti-related protein
IL1, 6	Interleukin
TNF-α	tumor nekroza faktor
TPO	Tireoperoksidaza
DUOX	dualna oksidaza
TBG	globulin koj vezuje tiroksin
TBPA	prealbumin koji vezuje tiroksin
TTR	transtiretrin
MMI	Metamizol
EGF	epidermalni faktor rasta
TGF	transformišući faktor rasta
GLUT4	glukoza transporter
ACTH	adrenokortikotropni hormon
LDL	lipoprotein male gustine
HDL	lipoprotein visoke gustine
PCB	polihlorirani bifenili
PBB	polibromirani bifenili
DDT	organohlorni prep
PBI	proteini koji vezuju jod

1. UVOD

Rađanje zdravog i vitalnog potomstva na govedarskim farmama je uslov za profitabilnu proizvodnju. Naime, uzgojem zdrave i vitalne teladi omogućava se postizanje boljih proizvodnih rezultata uz unapređenje genetske osnove stada. Na vitalnost teladi utiče, ne samo način njihovog držanja i ishrane, već i način držanja i ishrane njihovih majki, posebno tokom perioda kasnog graviditeta.

Odmah nakon rođenja telad treba da se prilagodi na potpuno nove, ekstaruterine, uslove života. Ovo prilagođavanje omogućeno je pravilnim razvojem adaptacionih mehanizama teladi. Tokom prvih sedam dana života procenat morbiditeta i mortaliteta je najveći, poređenjem sa kasnijim fazama života, upravo zbog činjenice da se mehanizmi adaptacije ne razvijaju u skladu sa potrebama jedinke za opstanak u novim uslovima života.

Neonatalni period karakteriše oslabljen imunski i energetski status jedinke, s obzirom da se novorođena telad rađaju bez imunoglobulina i sa značajno nižom koncentracijom glukoze u odnosu na stariju telad. Dodatno, IGF (Insulin-like growth factor) osovina, odgovorna za postnatalni rast jedinke, je nedovoljno razvijena. Da bi tele preživelo, neohodno je da se njegov metabolički, endokrini i imunski status u potpunosti razvije u prvih nekoliko dana nakon rođenja. Jedan od značajnih faktora koji utiče na pravilan razvoj adaptacionih mehanizama kod teladi je njihov razvoj tokom intrauterinog perioda života, koji u velikoj meri zavisi od metaboličkog, endokrinog i imunskog statusa gravidne majke. Zdravstveni status majke utiče na razvoj teladi i tokom postnatalnog perioda života teladi uzimajući u obzir da je kolostrum i mleko majke jedina hrana teladi tokom prvih sedam dana života. Stoga, neadekvatna ishrana i držanje majki značajno slabi odbrambene sposobnosti teladi i smanjuje mogućnost njihovog preživljavanja.

Adaptacija teladi podrazumeva značajne promene u endokrinom i metaboličkom statusu jedinke. Istraživanja sprovedena na eksperimentalnim životinjama i ljudima su pokazala da je sazrevanje tireoidne osovine od vitalnog značaja za rast i razvoj jedinke tokom prenatalnog i postnatalnog perioda života. Efekat tireoidnih hormona na rast i diferencijaciju različitih tkiva u organizmu se osvaruje u sinergizmu sa hormonom rasta odnosno ostalim komponentama somatotropne osovine. Tireoidni hormoni imaju značajan uticaj na pravilno odvijanje metaboličkih procesa u organizmu.

Hipotireoza novorođena teladi je, u uslovima intenzivne proizvodnje, često uzrokovana nedostatkom joda u organizmu novorođenčadi ili njihovih majki tokom graviditeta. Ovaj deficit je najčešće posledica nedovoljnog unosa optimalne količine joda hranom ili posebica unosa hrane koja sadrži goitrorene supstancije. Poseban značaj ima klinički nevidljiv deficit joda kod novorođenčadi koji onemogućava pravilno funkcionisanje tireoidne osovine i dovodi do smanjenja vitalnosti teladi.

Prema tome, imajući u vidu značaj statusa tireoidne osovine, posebno tokom ranog postnatalnog perioda života, kao i izostanak literaturnih podataka o uticaju neonatalne hipotireoze na endokrini i metabolički status novorođena teladi, postoji naučna opravdanost za sprovođenje istraživanja koje se odnosi na uticaj hipotireoze teladi, indukovane davanjem anti-tireoidnih supstanci njihovim majkama tokom kasnog graviditeta, na endokrini i metabolički status novorođenčadi odnosno njihovu sposobnost da se adaptiraju na ekstrauterine uslove života.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Tireoidna osovina i regulacija njene aktivnosti

Hipotalamus, adenohipofiza i štitasta žlezda su osnovne komponente tireoidne osovine (hypothalamic-pituitary-thyroid axis- HPT axis), koja mehanizmom negativne povratne sprege omogućava održavanje optimalne koncentracije tireoidnih hormona u cirkulaciji (Robins i sar., 1980; Kohn i sar., 1993). Tireoidna osovina uključuje dve klase hormona: peptidne hormone - tireoliberin (tireotropin oslobađajući hormon, TRH) i tireotropin (tireostimulirajući hormon, TSH) i derivate aminokiselina - tiroksin (T_4) i trijodtironin (T_3).

Tireoidna osovina i njene komponente funkcionišu na principu negativne povratne sprege, i primer je kako neuroendokrini sistem reguliše različite funkcije organizma tokom razvojnog i adultnog perioda (Laudet, 2011; Patell i sar., 2011). To je autoregulatorni mehanizam koji održava nivo sinteze tireoidnih hormona i njihove koncentracije u krvi i pored variranja u dostupnosti joda. Stabilnost proizvodnje hormona delimično se postiže i skladištenjem hormona, čime se reguliše efekat akutnog povećanja ili sniženja biosinteze hormona. Naime, autoregulatorni mehanizam tireoidne osovine, regulacijom nivoa biosinteze tireoidnih hormona, ima tendenciju održavanja konstantnog nivoa koncentracije hormona u cirkulaciji. Aktivnost tireoidne osovine i svake od njenih komponenti je osetljiva na variranja u koncentraciji i perifernoj dostupnosti tireoidnih hormona, jer veoma male varijacije aktiviraju mehanizam negativne povratne sprege u cilju korekcije koncentracije i dostupnosti tireoidnih hormona u tkivima.

Regulacija biosinteze i koncentracije tireoidnih hormona, te njihove dostupnosti u tkivima ostvaruje se na tri nivoa. Prvi nivo zasniva se na centralno regulisanom sistemu koji obezbeđuje konstantnost serumskih koncentracija tireoidnih hormona pomoću mehanizma negativne povratne sprege tj. osovine hipotalamus-hipofiza-štitasta žlezda. Drugi nivo je lokalni regulatorni sistem koga čine aktivni transmembranski receptori odgovorni za ćelijski transport hormona i aktivnost tkivno-specifičnih dejodinaza, odgovornih za aktivaciju/deaktivaciju hormona na nivou tkiva. Treći nivo podrazumeva

tkivno-specifičan regulatorni mehanizam hormonskog odgovora, koji se zasniva na regulaciji ekspresije tiroeidnih receptora. (Fekete i Lechan, 2014; Fliers i sar., 2014)

Na osnovu napred iznetog može se reći da tiroidna osovina (Astwood-Hoskins-ova osovina), kao sistem za regulaciju dostupnosti tiroeidnih hormona u tkivima, pored hipotalamusa, adenohipofize i štitaste žlezde, uključuje dejodinaze perifernih tkiva i transportere za tiroidne hormone (Sam i Frohman, 2008; Zoeller i sar., 2007; Fresema i sar., 2005; Feldt-Rasmussen i Rasmussen, 2007; Van der Deure i sar., 2010).

Najveći deo tiroksina (T_4) nalazi se vezan za proteine krvne plazme, i samo mali deo (0,02 – 0,03%) je dostupan konverziji u biološki aktivan oblik (T_3) i transport u citoplazmu ćelije (Degroot i Jameson, 2006; Dietrich i sar., 2012). Tiroidni plazma transporteri reverzibilno vezuju jodotironine, pre svega T_4 , čime održavaju stabilnost koncentracije tiroeidnih hormona u cirkulaciji i omogućuju stalno dostupan izvor/depo tiroeidnih hormona za potrebe tkiva, (Mendel i sar., 1987). Biološka aktivnost i metabolizam tiroeidnih hormona na nivou ćelija i tkiva je određena ćelijskim membranskim transportom. Naime, prisustvo i aktivnost specifičnih membranskih transportera reguliše intracelularnu koncentraciju tiroeidnih hormona (Jansen i sar., 2005). Intracelularna aktivacija tj. konverzija tiroksina u aktivni trijodtironin, nastaje 5' dejodinacijom spoljašnjeg prstena molekula tiroksina putem enzimske aktivnosti dejodinaza tipa 1 (DIO1) i tipa 2 (DIO2). Dejodinazna aktivnost reguliše intracelularnu dostupnost aktivnog oblika tiroeidnih hormona, a sa njom i efekat na datu ćeliju i tkivo (Bianco, 2011). Ekspresija i aktivnost DIO2 u tireotropnim ćelijama hipofize je značajan mehanizam u regulaciji stepena konverzije tiroksina u trijodtironin na nivou hipofize, a time i aktivnost kontrolnog mehanizma sekrecije TSH. Hormonska regulacija sekrecije TSH se primarno ostvaruje putem koncentracije T_4 , dok koncentracija T_3 reguliše one faktore tiroidne osovine koji su nezavisni od štitaste žlezde (Christoffolete i sar., 2006). Povećanje koncentracije tiroksina u cirkulaciji, a time i povećanje intracelularne koncentracije biološki aktivnog T_3 zbog povećane periferne lokalne aktivnosti dejodinaza (Gereben i sar., 2008), dovodi do značajnog pada koncentracije TSH, kao rezultat suprimiranja genske ekspresije TSH subjedinića (Shupnik i sar., 1986; Baquedano i sar., 2010).

Sve faze sinteze i sekrecije tiroeidnih hormona, počevši od preuzimanja joda iz cirkulacije pa do sekrecije u cirkulaciju i limfotok, su pod uticajem TSH. Regulacija

sinteze i sekrecije TSH zasniva se na dva kontrolna mehanizma, negativnoj sprezi sa koncentracijom tireoidnih hormona i nervnoj kontroli, primarno sekreciji TRH (Nikrodhanond i sar., 2006). Receptori za TSH (TSHR) se dominantno nalaze na tkivu štitaste žlezde, ali su nađeni i na ekstratireoidnom tkivu (Szkudlinski i sar., 2002).

Prisustvo TSHR na folikulo-stelatnim (FS) ćelijama hipofize je dokaz autoregulatornog mehanizma hipofize u sintezi i sekreciji TSH (Prummel i sar., 2000; Brokken i sar., 2005). Autoregulatorni mehanizam predstavlja ultrakratku osovinu (Brokken-Wiersinga-Prummel osovina) regulacije sinteze TSH (Prummel i sar., 2004). Smatra se da se ultrakratka osovina zasniva na parakrinoj regulaciji FS ćelija od strane tireotropnih ćelija. Jedan od mehanizma koji objašnjava parakrini mehanizam regulacije je taj da se sekretovani TSH vezuje za TSHR na FS ćelijama u svojoj okolini, pri čemu stimuliše ekspresiju membranskih transportera za tiroidne hormone (MCT8) i ekspresiju i aktivnost dejodinaze tipa 2 (DIO2), koji na nivou adenohipofize postoje samo u FS ćelijama. Tim mehanizmom se povećava lokalna koncentracija T_3 koja inhibira dalju sekretornu aktivnost tireotropnih ćelija (Fliers i sar., 2006).

Nervna kontrola sekrecije TSH je indirektni mehanizam, koji se zasniva na pozitivnom efektu TRH na tireotropne ćelije adenohipofize. Vezivanjem molekula TRH za TRH membranske receptore na tireotropnim ćelijama prednjeg režnja hipofize dolazi do pojačane sinteze i sekrecije molekula TSH (Weintraub i sar., 1989; Nikrodhanond i sar., 2006). Ovaj odgovor je brži u poređenju sa odgovorom na pomene koncentracije tireoidnih hormona, koji svoj efekat ostvaruju vezivanjem za nuklearne receptore unutar ćelije.

Sa druge strane, sinteza TRH u neuronima hipotalamusa i njegovo oslobađanje regulisani su koncentracijom tireoidnih hormona, i to putem mehanizma negativne povratne sprege (Koller i sar., 1987). Naime, tireoidni hormoni suprimiraju gensku ekspresiju i posttranslacione procese u sintezi molekula TRH u neuronima hipotalamusa i inhibiraju lučenje TRH u hipofizni portalni krvotok (Perello i sar., 2006), što predstavlja važan mehanizam za uspostavljanje referentnog kontrolnog nivoa (setpoint) povratne sprege u regulaciju sekrecije TSH. Niske koncentracije TRH u portalnom krvotoku hipofize smanjuju kontrolni nivo regulacije sekrecije TSH, tako da se supresija TSH može postići i nižom koncentracijom T_4 u cirkulaciji, dok veće koncentracije TRH povećavaju referentni nivo povratne sprege (Lechan i Kakuscka, 1992).

Efekat inhibicije sekrecije TRH ostvaruje se direktnim vezivanjem tireoidnih hormona za receptore eksprimirane na TRH neuronima paraventricularnog nukleusa (PVN) i visokim nivoom vaskularizacije PVN. Sistemska aplikacija T_3 ili implantacija biološki aktivnih kristala T_3 u PVN hipotalamusa kod hipotireoidnih pacova, dovodi do inhibicije genske ekspresije TRH i smanjenja koncentracije mRNA za TRH u TRH sekretornim ćelijama (Dyess i sar., 1988). Nivo koncentracije T_4 u moždanoj cirkulaciji, enzimsko aktivacija dejodinacijom u T_3 , kao i dostupnost T_3 neuronima koji sekretuju TRH, od suštinskog su značaja za negativnu povratnu spregu u regulaciji sekrecije TRH.

Transport T_4 u moždano tkivo je efikasniji od transporta T_3 , tako da više od 80% T_3 prisutnog u moždanom tkivu nastaje lokalnom dejodinacijom uz pomoć dejodinaza tipa 2 (Hagen i Solberg, 1974; Crantz i sar., 1982). Distribucija i aktivnost DIO2 u hipotalamusu je najveća u mediobazalnom hipotalamusu (MBH), eminenciji mediani, arkuatnom nukleusu i ventromedijalnom nukleusu (VMN). Neuron PVN su ćelije koje pokazuju nisku aktivnost DIO2, tako da aktivni T_3 u PVN neurone dospeva kroz cerebrospinalnu tečnost (CSF), glijna ćelije ili putem transneuralnog transporta (Riskind i sar., 1987). Potencijalni izvor enzimske aktivacije T_4 u T_3 su tanaciti, specijalizovane ependimske ćelije koje oblažu dno treće moždane komore, delove eminencije mediane i infundibularnog recesusa. To su ćelije sa najvišom aktivnošću DIO2 (Rodriguez i sar., 2005). Anatomsko lokalizacija i morfološke karakteristike tanacita ukazuju na to da tanaciti ostvaruju kontakt sa CSF, i pomoću procesusa na apikalnoj strani koji se protežu do kapilarnog portalnog sistema, eminencije mediane i arkuatnog nukleusa ostvaruju kontakt i sa cirkulacijom. To ukazuje da su tanaciti ćelije koje mogu da koriste T_4 iz CSF ili cirkulacije i nakon dejodinacije, snabdevaju CSF dovoljnom koncentracijom T_3 . T_3 pomoću specifičnih transportera dospeva do ekstracelularnog prostora u moždanom tkivu, a pri tome i u region PVN gde direktno utiče na hipofiziotropne TRH neurone (Rodriguez i sar., 2005).

Alternativan način distribucije je oslobađanje T_3 na nivou eminencije mediane, kako bi se ostvarilo prihvatanje i retrogradni transport T_3 u aksonske terminale TRH neurona, ili distribucija T_3 u arkuatni nukleus kroz nervne interakcije tanacita i arkuatnih neurona koje imaju projekcije do TRH neurona u PVN (Lechan i Fekete,

2004). Visoka aktivnost i ekspresija DIO2 je takođe karakteristična za astrocite hipotalamusa i arkuatnog nukleusa (Guadano-Ferraz i sar., 1997).

Membranski transport tireoidnih hormona do CSF i ćelija je aktivan proces koji uključuje nekoliko membranskih transportera (Jansen i sar., 2005), od kojih su najznačajniji monokarboksilatni transporteri (MCT) i familija organskih transportnih polipeptida (OTAP). MCT8 je aminokiselinski transporter koji se pruža kroz membrane pre svega neurona, ali i neuroglia ćelije, a pospešuje transport T_3 , T_4 , rT_3 , T_2 (Friesema i sar., 2003). Drugi transporter specifičan za T_4 je OTAP1C1, prisutan na moždanim kapilarima, za koji se smatra da omogućava transport T_4 od cirkulacije do astrocita ili CSF (Jansen i sar., 2005). Mehanizam transporta T_4 u horioidni pleksus ili tanacite nastaje kao rezultat aktivnost membranskog transportera OTAP1C1, koji je negativnom spregom regulisan od strane koncentracije tireoidnih hormona (Sugiyama i sar., 2003). Transport T_4 koji se nalazi u CSF u tanacite nastaje pomoću MCT8 membranskog transportera. T_4 u tanacitima i astrocitima dejodinacijom uz pomoć DIO2 prelazi u T_3 , da bi ovaj nakon aktivacije, preko MCT8 transportera, napustio ćeliju i postao dostupan neuronima. Transport T_3 u TRH neurone omogućen je aktivnošću MCT8 membranskih transportera (Bernal, 2005). Konačno, ovaj kompleksan mehanizam koji povezuje koncentracije jodotironina i njihova dostupnost u CNS, sa nivoom sinteze i sekrecije TRH, primarno ima za cilj održavanje stabilne koncentracije tireoidnih hormona u cirkulaciju, predstavlja dugačku negativnu povratnu spregu unutar tiroidne osovine (Lechan i Fekete 2004; Fekete i Leshan, 2007).

U zaključku ovog poglavlja može se napomenuti da je aktivnost tireoidne osovine rezultat kompleksne međusobne interakcije hipotalamusa, adenohipofize i štitaste žlezde, ali na njenu funkciju snažno direktno ili indirektno utiču i ekstratiroidni faktori. Primarni faktor koji utiče na fiziološko funkcionisanje tireoidne osovine je unos dovoljnih količina joda u štitastu žlezdu za sintezu hormona (Fisher i sar., 2013; Gilbert i sar., 2013). Endogeni faktori, kao što su starost, pol i fiziološko stanje i spoljašnji faktori, kao što su klima, sezona i način ishrane utiču na više moždane strukture (jedra hipotalamusa) i sinapstičkom interakcijom mogu uticati na mehanizme funkcioniranja tireoidne osovine.

Promene funkcionisanja tireoidne osovine su karakteristična za patološka stanja, deficit ili suficit joda, unos goitrogenih materija, fitoestrogena ili ostalih endogenih ili

egzogenih hormona, kao i unosa lekova ili materija koje utiču na mehanizam funkcioniranja tiroidne osovine.

2.2. Tireotropin oslobađajući hormon

Tireotropin oslobađajući hormon – TRH je peptidni proizvod hipofiziotropnih nerona hipotalamusnih jedara, koji ima ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti tireotropne osovine. On je dominantni hipotalamusni regulator sinteze i sekrecije TSH i sinteze tireoidnih hormona. Tireoidni hormoni mehanizmom negativne povratne sprege regulišu sekreciju TRH (Nikrodhanond i sar., 2006). Sinteza TRH nije ograničena samo na nukleuse hipotalamuusa, već je utvrđena i u neuronima drugih moždanih struktura i perifernih tkiva. TRH je široko rasprostranjen neurotransmiter u centralnom i autonomnom nervnom sistemu i takođe je jak prolaktin oslobađajući faktor (PRF) (Jakson, 1982).

Sinteza molekula TRH nastaje u TRH hipofiziotropnim neuronima koji se nalaze u paraventrikularnim jedrima (PVN-paraventricular nucleus) lociranim u blizini treće moždane komore. Paraventrikularna jedra su formirana od magnocelularnih i parvocelularnih neurona. Parvocelularne grupe neurona formiraju manje grupe neurona: prednje, medijalne, periventrikularne, ventralne, dorzalne i lateralne grupe (Lechan i Toni, 2003). Prednji, medijalni i periventrikularni neuroni su glavni neuroni koji sintetišu TRH, ali jedino parvocelularne medijalne i periventrikularne grupe neurona imaju projekcije sve do eminencije medijane. Nakon biosinteze u hipotalamusu i tokom posttranslacione obrade, molekuli TRH peptida se transportuju dužinom aksona sve do terminalnog dela aksona u regiji eminencije medijane, gde se sekretuju u blizini fenestriranih kapilara hipofiznog portalnog krvotoka (Toni i Lechan, 1993). Sekretovani TRH putem portalnog krvotoka hipofize dolazi do prednjeg režnja hipofize, gde deluje na ciljne tireotropne ćelije.

Tireotropna zona paraventrikularnog jedra je zona gde se pored TRH neurona nalaze aferentni završeci neurona koje polaze sa drugih regiona mozga. Inputi ovih neurona moduliraju kontrolni nivo povratne sprege tireoidnih hormona i sintezu TRH u situacijama kada je potreban viši ili niži nivo tireoidnih hormona. To su neuroni sa najmanje 3 regiona sa najvećim brojem projekcija na TRH neurone, a čine ih kateholaminski neuroni moždanog stabla (Sawchenko i Swanson, 1982), neuroni

arkuatnog jedra hipotalamusa (ARC) (Legradi i Lechan 1998) i dorzomedijano jedro hipotalamusa (DMH) (Mihály i sar., 2001).

Adrenergični neuroni su značajni stimulatori sinteze TRH i sadrže još dva neuropeptida: CART i NPY (Wittmann i sar., 2002; Wittmann i sar., 2004). Neuroni arkuatnog jedra sadrže namanje dve grupe neurona koja su direktno regulisani leptinom. Prva grupa neurona sintetiše oriksogene peptide NPY i AGRP koji su inhibirani leptinom, a druga grupa neurona sadrži anoriksogene peptide α -MSH i CART koji su stimulirani leptinom (Legradi i Lechan, 1998; Legradi i Lechan, 1999; Fekete i sar., 2000a; Fekete i sar., 2000b). Neuroni arkuatnog jedra su takođe pod direktnim uticajem koncentracije glukoze i insulina, s tim da insulin ima slične efekte leptina na NPY i α -MSH, dok glukoza ima efekat jedino na NPY (Fekete i sar., 2006). Neuroni DMH takođe mogu direktno detektovati metaboličke signale (leptin, insulin, glukoza). Smatra se da uticaj neurona DMH na neurone TRH indirektan, tj. interakcije neurona ARC jedra i njihova peptida su zavisne od peptida ARC jedra (Mihály i sar., 2001; Singru i sar., 2005).

Neuroendokrini regulatorni faktori mogu uticati na gensku ekspresiju TRH i time modulirati referentni kontrolni nivo (setpoint) negativne povratne sprege. Pozitivni efekat na ekspresiju gena za TRH, njegovu biosintezu i sekreciju imaju kateholamini (Perello i sar., 2007). Vezivanjem za adrenergične receptore na TRH neuronima, kateholamini aktiviraju TRH promoter aktivacijom CREB fosforilacije. Ovaj mehanizam je aktivan tokom izloženosti jedinke niskim temperaturama (Arancibia i sar., 1989; Thonberg i sar., 2002). In vivo, tokom niske temperature, noradrenalin je glavni medijator aktivacije tireoidne osovine na hipotalamusnom nivou i stimulator biosinteze TRH (Perello i sar., 2007). Smatra se da su β adrenergični receptori primarni u aktivaciji procesa biosinteze, dok su α adrenergični receptori značajni za sekreciju TRH (Perello i sar., 2007). Adrenergični neuroni sinaptički vezani za TRH neurone pored kateholamina sadrže još dva neuropeptida (CART i NPY) koji takođe moduliraju sintezu TRH. Pozitivni efekat na sintezu TRH ima CART (cocaine-and-amphetamine regulated transcript) koji pojačava efekat kateholamina, dok neuropeptid γ (NPY) ima inhibitorski efekat na transkripciju TRH inhibirajući cAMP-CREB signalnu kaskadu (Wittmann i sar., 2002; Wittmann i sar., 2004). Zajednički negativni efekat sa NPY ima i AGRP (agouti-related protein) koji deluje kao antagonist α -MSH-u. Povećanje

sekrecije NPY i AGRP je rezultat niske koncentracije leptina tokom gladovanja i niskog nivoa energetske rezervi (Lechan i Fekete, 2006). Pozitivna regulacija TRH genske ekspresije direktnim mehanizmom ostvaruje i α -MSH (α melanocyte-stimulating hormone) vezivanjem za melanokortin 4 receptora (MCR4) utvrđena na TRH neurone. Sinteza i sekrecija α -MSH regulisana je koncentracijom leptina. Povećane koncentracije leptina tj. pozitivni energetski input, pozitivno utiče na sintezu i sekreciju α -MSH (Mountjoy i sar., 1992; Harris i sar., 2001). Leptin može aktivirati transkripciju TRH direktnim vezivanjem za ObRb receptor na TRH neuronu, pri čemu nastaje aktivacija na JAK (Janus tyrosine kinase) kaskadnom sistemu i fosforilacija STAT3 (signal transducer of activated transcription) proteina koji se vezuje za TRH promotor (Harris i sar., 2001; Huo i sar., 2004). Glukokortikosteroidi utiču na tireoidnu osovину modulirajući sintezu TRH, uglavnom direktnim i indirektnim mehanizmom kroz aktivnosti na nivou CNS (Kakucska i sar., 1995). Direktni mehanizam ostvaruje se preko glukokortikoidnih receptora na TRH neuronima i preko prisustva GRE (glucocorticoid response element) na TRH genu (Cintra i sar., 1990; Lee i sar., 1988). Indirektni mehanizam zasniva se na tome da glukokortikoidi imaju inhibitorski efekat na tireoidnu osovину preko indirektnog negativnog efekta na hipokampus. Smatra se da se preko hipokampalne supresije HPA (hipotalamus – hipofizna - adrenalna) osovine, povećava nivo kortizola i hipofiznog TRH kod pacova (Shi i sar., 1993). Stimulatorski efekat glukokortikoida je utvrđen i in vitro u kulturi hipotalamusnih ćelija, pri čemu smatra se da je supresija sinteze TRH posredovana indirektnim putem (Luo i sar., 1995). Novija in vivo istraživanja pokazuju da glukokortikosteroidi inhibitorski deluju na TRH gensku ekspresiju na nivou paraventrikularnog nukleusa, direktnim mehanizmom (Alkemade i sar., 2005).

Sinteza krajnjeg molekula TRH uključuje i posttranslacione procese ili modifikacije koje nastaju tokom transporta putem regulatornog sekretornog puta (RSP-regulatory secretory pathway). Ovi procesi uključuju i dva člana familije prohormonske konvertaze (PC), PC1/3 i PC2 koje se nalaze u sekretornim granulama neurona (Nillni i Sevarino, 1999). Prohormonske konvertaze cepaju TRH tripeptid u regionu dvojnih baznih aminokiselina. Sa intermedijarnih produkata se zatim dejstvom egzopeptidaza, kao što su karboksil peptidaza E i D (CPE, CPD) odstranjuju dvojni bazni ostaci na C terminalnom kraju, pri čemu se dobija intermedijarna sekvenca Glu-His-Pro-Gly. Na

intermedijarnoj sekvenci nastaje amidacija na karboksilnom kraju sa peptidilglicinskom α amidirajućom monooksigenazom (PAM) (Eipper i sar., 1992; Perello i Nillni, 2007). Ekspresija i aktivnost prohormonske konvertaze i karboksil peptidaze su značajni u regulaciji sinteze i sekrecije TRH, a time imaju uticaj na kontrolni nivo (setpoint) povratne sprege u regulaciji sekrecije TSH (Perello i sar., 2006). TRH tripeptid čini veliki dio molekula prohormona, ali pro-TRH kod pacova daje još sedam dodatnih peptida koje imaju specifičnu tkivnu distribuciju. Peptid pro-TRH (160-169) se luči iz delova hipotalamusa i potencira rilizing efekte hormona TRH. Pro TRH (178-199) se luči u eminencija medijana i smatra se da ima inhibitorni efekat na lučenje ACTH (Nillni i Sevarino, 1999).

Pored jedra hipotalamusa, ProTRH mRNA je prisutna i u strukturama moždanog tkiva van PVN (olfaktorni bulbus, lateralna hipotalamusna zona, eminencija medijana, preoptička regija, moždano stablo) i u tkiva van mozga (β ćelije pankreasa, gastrointestinalni trakt, tkiva genitalnog i urinarnog sistema, prostata, Leydgove ćelije epididimisa, semenim vezikule) (Guillemin, 2005).

2.2.1. Fiziološka uloga

Primarna funkcija TRH je stimulacija sinteze, sekrecije i regulacije funkcije TSH. TRH stimuliše aktivaciju specifičnih transkripcionih regulatornih faktora i sintezu a-TSH i b-TSH sujediniče. Takođe, TRH reguliše glikolizaciju i kombinaciju subjediniča TSH molekula. Nakon sekrecije iz aksonskog završetka u eminenciju medijanu, molekul TRH se vezuju za specifične TRH receptore (TRH-R) na membrani TRH senzitivnih ćelija hipofize (Yu i sar., 1998). Prisustvo mRNA za TRH receptore je potvrđeno na tireotropnim, laktotropnim i somatotropnim ćelijama (Konaka i sar., 1997).

Danas su poznata dva subtipa TRH receptora (TRH-R1 i TRH-R2) sa različitom distribucijom u tkivima. TRH-R1 je najzastupljeniji na membrani adenohipofiznih ćelija (Sun i Gershengorn, 2003), ali je prisutan i u nekim perifernim tkivima (srce, slezena, jetra, skeletna muskulatura, tkiva digestivnog sistema, pankreas, testisi i bubreg) (Mitsuma i sar., 1995). Tkivna distribucija TRH-R2 je primarna u somatosenzornim regionima CNS, što ukazuje na to da je on verovatno regulator neurospecifične funkcije TRH (Kaur i sar., 2005). Oba pomenuta receptora su rodopsin/ β adrenergični receptori

koji pripadaju familiji G protein-vezanih receptora (GPCR–G protein-coupled receptor) (Sun i Gershengorn, 2003).

Pored funkcija koje se odnose na regulaciju sinteze TSH i tireoidnih hormona, TRH ima i široki spektar netireotropnih efekta, kao što je jaka stimulacija sekrecije prolaktina (Freeman i sar., 2000). Vezivanjem za TRH receptor na laktotropima, TRH pokreće kaskadni mehanizam fosforilacije i povećanja intracelularnog nivoa Ca^{2+} , koji aktivira gensku ekspresiju, sintezu i sekreciju prolaktina (Tabares i sar., 2014). Kod krava je karakteristično da TRH predstavlja potentan stimulator laktacije uz povećanje sekrecije prolaktina, ali i povećanje koncentracije hormona rasta (GH) (Convey i sar., 1973; Johke, 1978; Kazmer i sar., 1986). Pozitivni efekat na sekreciju GH je utvrđen i kod novorođene teladi (Coxam i sar., 1987). Smatra se da je mehanizam stimulacije sekrecije GH kod goveda od strane TRH delimično indukovano serotoninom (Radcliff i sar., 2003). Efekat TRH na sekreciju GH kod ostalih životinja je različit i zavisi od vrste životinja i fiziološkog stanja (Anderson i sar., 2004). Takođe je utvrđeno da tokom centralne administracije TRH daje efekat “buđenja“ i antagonistički efekat sedativima i opijatima, izaziva analgeziju, neuro-autonomne efekte (povećava motornu aktivnost, regulaciju cefalične faze digestije, ima pozitivni efekat na cirkulaciju), neuromodulatorni efekat (povećava tonus muskulature, potencira efekte serotonina i pojačava metabolizam dopamina, norepinefrina i acetilholina), ima centralni negativni efekat na unos hrane kao bihevioralni efekat (antidepresantni efekat) (Lechan i Fekete, 2006).

2.3. Tireostimulirajući hormon

Morfološka i funkcionalna regulacija aktivnosti tireocita ostvaruje se pomoću tireostimulirajućeg hormona (TSH, tireotropin), interakcijom hormona sa TSH receptorom (TSHR). TSH je glikoprotein koga sintetišu i luče tireotropi prednjeg režnja hipofize. On je značajan regulator aktivnosti tireoidne osovine koji vrši modulaciju sinteze i sekrecije tireoidnih hormona (Szkudlinski i sar., 2002), regulišući tireocitni metabolizam joda, rast, hipertrofiju, hiperplaziju i diferencijaciju tireocita. Sinteza i sekrecija TSH je regulisana pozitivnim uticajem TRH i negativnim odgovorom na povišenu koncentraciju tireoidnih hormona.

Sinteza TSH se odvija u tireotropima prednjeg režnja hipofize. Tireotropi su najmanje poligonalne ćelije za koje su karakteristične bazofilne granule u citoplazmi koje sadrže TSH. Lokalizovani su u anteromedijalnim delovima pars distalis prednjeg režnja hipofize, gde sačinjavaju do 10% ukupnog broja funkcionalnih ćelija (Yeung i sar., 2006). Tireotropi su ćelije koje pripadaju grupi ćelija za koje je karakterističan tzv. Pit1 transkripcioni faktor (njegova ekspresija je prisutna i u somatotropnim i laktotropnim ćelijama) i transkripcioni faktor GATA-2 (prisutan i kod gonadotropnih ćelija) (Dasen i sar., 1999). Regulacija ekspresije ovih faktora je značajna za proliferaciju i citološku diferencijaciju ovih ćelija (Yeung i sar. 2006). Eksperimenti sa indukovanim, prolongiranim i primarnim hipotiroidizmom kod pacova ukazuju na mogućnost funkcionalne transformacije ćelija tj. transdiferencijacije somatotropnih u tireotropne ćelije čime se pokazalo da ne postoje striktno funkcionalne klasifikacije ćelija (Radian i sar., 2003). Transdiferencijacija ćelija je rezultat prisustva zajedničkih transkripcionih faktora tokom ontogeneze ćelije.

2.3.1. Struktura, sinteza i sekrecija

Tireostimulirajući hormon je član familije glikoproteinskih hormona zajedno sa folikulostimulirajućim hormonom (FSH), luteinizirajućim hormonom (LH) i humanim gonadotropinom (hCG) (Pierce i Parsons, 1981). TSH je heterodimer formiran od nekovalentno povezane glikoproteinske α i β subjedinice. Subjedinica α je po strukturi identična sa α subjedinicom LH, FSH i hCG hormona (α -GSU), dok je ekspresija β subjedinice za TSH specifična za tireotrope i odgovorna je za funkcionalnu specifičnost hormona (Shupnik i sar., 1989). Subjedinica α bovinog TSH je molekulske mase oko 13,6 kDa od kojih oko 10,8 kDa čini proteinsko jedro sa 96 aminokiselina, a 2,8 kDa (21%) čine dve oligosaharidne jedinice. β subjedinica bovinog TSH je molekulske mase oko 14,7kDa od kojih je 13 kDa sastavljeno od proteinskog jedra sa 113 aminokiselina, a oko 1,6kDa (12%) čine oligosaharidne jedinice (Liao i sar., 1971; Gesundheit i Weintraub, 1986). Humani i bovini TSH karakteriše strukturalna identičnost α subjedinice od 74,1%, i identičnost β subjedinice od 88,4% (Szkudlinski i sar., 1996). Bovini TSH pokazuje visoki afinitet prema humanom TSH receptoru, kao i 6 do 10 puta jaču signalnu aktivnost od humanog TSH. Osobine bovinog TSH su primarno određene aminokiselinskom sekvencom α subjedinice (Yamazaki i sar., 1995; Mueller i sar

2009). α i β subjedinice TSH su kodirane na različitim genskim lokacijama na različitim hromozomima. Gen α subjedinice humanog TSH lociran je na hromozom 6, dok gen β subjedinice nalazi na hromozom 1 (Naylor i sar., 1983). Genska ekspresija je regulisana transkripcionim faktorima karakterističnim za tireotrope koji se vezuju za genske regulatorne regione i regulišu proces transkripcije. Regulacija transkripcije ostvaruje se stimulativnim efektom TRH i negativnim efektom T_3 . Genska regulacija α subjedinice TSH je specifična za tireotrope i pored toga što se gen za alfa subjedinicu eksprimira i na gonadotropima. Gen α subjedinice (9,4 kb) je veći od gena β subjedinice (4,9 kb) i formiran je od četiri egzona i tri introna (Fiddes i sar., 1981). Proksimalne promotorske sekvence genskog promotorskog regiona su odgovorne za transkripciju α subjedinice (Sarapura i sar., 1998). Smatra se da su ključni faktori aktivacije transkripcije funkcionalna interakcija hipofiznog glikoproteinskog bazalnog elementa (PGBE) koji se nalazi na proksimalnom promotorskom regionu, i specifičnog hipofiznog transkripcionog proteinskog faktora LIM (P-LIM, mLIM3, Lhx3) (Roberson i sar., 1994; Bach i sar., 1995). Struktura gena β subjedinice je specifična za različite vrste (Yanga i sar., 2000; Xu i Jiang 2012; Huang i sar., 2013). Gen β subjedinice humanog TSH je sačinjen od 3 egzona i 2 introna (Wondisford i sar., 1988). Aktivacija transkripcije β subjedinice nastaje interakcijom transkripcionog faktora Pit1 (Pou1F1) i transkripcionog faktora GATA2 na sekvencama promotorskog regiona (Gordon i sar., 1997). U aktivaciji transkripcije utiče i dodatni transkripcioni faktor – koaktivator MED1 (TRAP220, PBP) (Gordon i sar., 2006). Pozitivna regulacija TRH na sintezu TSH ostvaruje se aktivacijom transkripcije na obe TSH subjedinice. Aktivacija beta subjedinice je rezultat vezivanja prethodno fosforiliziranog CREB vezujućeg proteina za transkripcioni faktor Pit1 sa vezujućim domenima. Novostvoreni kompleks u sinergističkom delovanju aktivira proces transkripcije (Hashimoto i sar., 2000). Smatra se da sličan mehanizam aktivira i transkripciju prolaktina. Pored β jedinice, aktivacija genskog promotera α jedinice nastaje vezivanjem fosforiliziranog CREB vezujućeg proteina za P-LIM transkripcioni proteinski faktor (Hashimoto i sar., 2000). Negativnu regulaciju transkripcije i sinteze TSH subjedinice ostvaruje T_3 (Shupnik i sar., 1989). Supresija transkripcije vrši se istovremeno za obe subjedinice, ali većom brzinom i intenzitetom na beta subjedinici. Regulacija intraćelijske koncentracije T_3 zavisi od dostupnosti T_4 i aktivnosti DIO2. T_3 receptor je nuklearni receptor i ligand-zavisan

transkripcioni faktor (Cheng i sar., 2010). Transkripcija T_3 receptora je kodirana na nivou dva različita alela i nalazi se u obliku $TR\alpha$ i $TR\beta$. Aktivacija transkripcije T_3 receptora je zavisna od T_3 (Cheng i sar., 2010). Kompleks koji nastaje nakon vezivanja T_3 za receptor, posebno $TR\beta$ ($T_3/TR\beta$) je ključni faktor supresije transkripcije transkripcionih faktora TSH β subjedinice. Supresija je primarno na transkripcionom faktoru GATA2 (Matsushita i sar., 2007). Supresija transkripcije α subjedinice nastaje interakcijom kompleksa T_3/TR , nuklearnim korepresorima (CoRs) i aktivacijom histonske deacetilacije (HDAC) na inicijalnim transkripcionim regionima (Tagami i sar., 1999; Wang i sar., 2009). Translacija mRNK za TSH α i TSH β subjedinice nastaje nezavisno za obe subjedinice na ribozomima u citosolu (Chin i sar., 1978). Kompletna translacija nastavlja se u lumenu endoplazmatičnog retikuluma, gde se i završava cepanjem signalnih peptida.

Sinteza biološki aktivnog molekula TSH uključuje i složeni proces glikozilacije i strukturne transformacije subjedinice. Glikozilacija je dvofazni proces koji počinje pre translacije i uključuje glikozilaciju obe subjedinice (kotranslacijska glikozilacija), a zatim postranslaciono dolazi do još jedne glikozilacije α subjedinice (Gesundheit i Weintraub, 1986). Pretranslaciona glikozilacija uključuje vezivanje manozoligosaharidne jedinice za asparaginske ostatke pomoću enzima oligosaharid-transferaza. Prvi korak glikozilacije odvija se u endoplazmatičnom retikulumu, gde nastaje i prva enzimska obrada oligosaharidne jedinice enzimima manozidaza I i II (Elbein, 1991). Tokom kotranslacione glikozilacije u endoplazmatičnom retikulumu nastaje i konformacijsko oblikovanje subjedinice i formiranje disulfidne veze koje omogućava stabilnost molekula. Kasnije faze glikozilacije se produžavaju, u početku u proksimalnom cis-Goldži-kompleksu, a zatim u trans-Goldži-kompleksu u sekretornim granulama (Kornfeld i Kornfeld, 1985). Bovina TSH β subjedinica ima samo jedno mesto glikozilacije, ostatak asparagina na poziciju 23, dok α subjedinica ima dva mesta glikozilacije, ostatak asparagina na poziciju 56 i 82 i još jedno dopunsko mesto za koje se smatra da je ostatak koji je značajan tokom kombinacije sa β subjedinicom (Magner i Weintraub, 1982). U sastavu oligosaharidnog kompleksa na α i β subjedinici nalaze se heksoze, heksozamin i sijalinska kiselina. Enzimska sulfatacija i sijalinacija koje nastaju u kasnijim fazama tokom glikozilacije u distalnom trans-Goldži-kompleksu, predstavljaju regulatorni mehanizam koji utiče na bioaktivnost molekula

TSH. Sulfatacija N-acetilgalaktozaminskog ostatka povećava bioaktivnost, dok vezivanje sijalinske kiseline ili njihovih prekursora za galaktozidne ostatke, smanjuje bioaktivnost i produžava vreme poluraspada TSH molekula u serumu (Magner, 1990; Szkudlinski i sar., 1995). Glikozilacija je složeni proces koji je značajan za stabilizaciju TSH molekula i precizno molekularno oblikovanje i kombinovanje α i β subjedinice, a ima i protektivnu ulogu jer pravilnom glikozilacijom nastaje pravilno sklapanje peptidnih lanca i precizno formiranje unutrašnje disulfidne veze, čime se ograničava intracelularna degradacija molekula TSH (Weintraub i sar., 1980; Grossmann i sar., 1997). Proces kombinovanja obe subjedinice počinje nakon translacije u ribozomima endoplazmatičnog retikuluma, a završava se u Goldži-kompleksu (Magner i Weintraub, 1982). Celokupni proces glikozilacije i kombinacije subjedinica TSH molekula je regulisan TRH i tireoidnim hormonima (Persani, 1998). Povećanje koncentracije TRH dovodi do povećanja stepena glikozilacije, a time i povećanja biološke aktivnosti TSH (Ponsin i Mornex, 1983; Taylor i Weintraub, 1985). Novija istraživanja ukazuju da kod primarnog hipotiroidizma nastaje povećanje stepena sijalinizacije što ukazuje da niske koncentracije tireoidnih hormona i visoke koncentracije TRH dovode do smanjenje bioaktivnosti molekula TSH odnosno da su tireoidni hormoni pozitivni regulatori bioaktivnosti TSH (Oliveira i sar., 2007).

Unutarćelijska sinteza i sekrecija TSH primarno je regulisana TRH indukovanim kaskadnim mehanizmom bifaznog povećanja intracelularne koncentracije jona kalcijuma i promenom potencijala ćelijske membrane (Geras i Gersherngorn, 1982). TRH direktno utiče na sekreciju TSH tako da imunoneutralizacija molekula TRH ili lezije paraventrikularnog nukleusa kod životinja dovode do pada koncentracije TSH u cirkulaciji (Fraser i McNeilly, 1982; Aizawa i Green, 1981).

Pored TRH hipotalamusa koji reguliše sintezu i sekreciju TSH, modulacija sinteze i sekrecije TSH ostvaruje se drugim hipotalamusnim i perifernim inhibitornim ili stimulirajućim faktorima. Somatostatin ima inhibitorni efekat na sekreciju TSH kod čoveka i životinja in vivo i in vitro (Klaff i sar., 1982; Urman i Critchlow, 1983; Lamberts i sar., 1989). Najveća koncentracija somatostatinskih neurona u hipotalamusu se nalazi u prednjem paraventrikularnom regionu, a aksoni ovih neurona se pružaju do eminencije medijane (Van Vugt i sar., 2008). Lezije ovih regiona kod životinje dovode do pada koncentracije somatostatina u regionu eminencije medijane i povećanja

serumske koncentracije TSH (Urman i Critchlow, 1983), što ukazuje da hipotalamus možda ima dvojnju simultanu kontrolu sinteze TSH, kroz stimulaciju pomoću TRH, sa jedne strane, i inhibiciju preko sekrecije somatostatina sa druge strane. Inhibitorni efekat somatostatina ostvaruje se vezivanjem za dva od ukupno pet subtipova somatostatinskih transmembranskih receptora, subtip (SST) 1 i subtip 5, koji se nalaze na membrani tireotropa (Patel, 1999). Vezivanjem za ove receptore, somatostatin inhibira adenilat ciklaznu aktivnost kroz G regulatorni protein, što dovodi do pada aktivnosti protein kinaze A, a time i smanjenja sinteze TSH. Inhibitorni mehanizam ostvaruje se takođe i kroz adenilat ciklaza nezavisan mehanizam, i to smanjenjem intraćelijske koncentracije kalcijuma kroz inhibitorni efekat na jonske kanale kalcijuma i smanjeni ekstraćelijski influks kalcijuma (Patel, 1999). Istraživanja na hipotireoidnim pacovima ukazuju na to da tireoidni hormoni regulišu gensku ekspresiju somatostatinskih receptora kroz direktni efekat na tireotrope. U slučaju niske koncentracije tireoidnih hormona smanjuje se ekspresija somatostatinskih receptora, a time se smanjuje i inhibitorni efekat na sintezu TSH (Lam i Wong, 1999). Pozitivan efekat tireoidnih hormona na ekspresiju somatostatinskih receptora, a time i negativan efekat somatostatina na sintezu TSH je utvrđen i in vitro uslovima na kulturi ćelija bovine adenohipofize (Ridgway i sar., 1983).

Veliki broj neurotransmitera ima direktni ili indirektni modulatorni efekat na sintezu i sekreciju TSH. Indirektni efekat se ostvaruje kroz brojne aksonske projekcije neurona koja sadrže dopamin, serotonin, histamin, kateholamine, opoide i GABA, koji završavaju na hipofiziotropnim neuronima. Direktni efekat na sintezu i sekrecije TSH je rezultat aksonske projekcije neurona koji luče neurotransmitere u hipofizni portalni krvotok i direktno utiču na ćelije adenohipofize, što je karakteristično za dopaminergične neurone arkuatnog nukleusa. Dopamin je inhibitor sinteze i sekrecije TSH in vivo i in vitro (Cooper 1983). Direktnu inhibiciju sekrecije TSH dopamin ostvaruje vezivanjem za dopaminske receptore tipa 2 (DA₂), i to mehanizmom inhibicije adenilat ciklazne aktivnosti (Foord i sar., 1983) i inhibicijom transkripcije mRNA gena za α i β TSH subjedinice (Shupnik i sar., 1986). Regulatorni efekat dopamina je takođe i indirektan. Kod pacova, utvrđen je stimulatorni efekat na sekreciju TRH na nivou hipotalamusa i stimulatorni efekat na sekreciju somatostatina (Lewis i sar., 1987; Lewis i sar., 1986).

Adrenergična regulacija sinteze i sekrecije TSH može biti centralna, kroz stimulaciju sekrecije TRH i direktna, efektom kateholamina na tireotrofe. Centralna stimulacija sinteze TSH ostvaruje se vezivanjem kateholamina za α adrenergične receptore TRH neurona i stimulacijom sinteze i sekrecije TRH. Prisustvo kateholamina u relativno visokim koncentracijama u portalnom krvotoku hipofize ukazuje na direktni efekat kateholamina na tireotrope (Johnston i sar., 1983). Alfa adrenergična aktivacija tireotropa stimuliše sintezu i sekreciju TSH u tireotropima hipofize goveda i pacova in vitro i in vivo (Klibanski i sar., 1983; Peters i sar., 1983). Stimulatorni efekat kateholamina ostvaruje se vezivanjem za α_1 adrenergične receptore, što dovodi do aktivacije mehanizma adenilat ciklaze (Alarcón i sar., 2001). Na taj način dopamin i kateholamini imaju antagonistički efekat na sintezu i sekreciju TSH.

Glukokortikoidi suprimiraju sintezu i sekreciju TRH i TSH (Mitsuma i Nogimori, 1982), tako što smanjuju koncentraciju TSH u serumu indirektnom supresijom TRH na nivou hipotalamusa (Alkemade i sar., 2005). Utvrđen je i direktni supresivni efekat glukokortikoida na tireotrope i sekreciju TSH, ali radovi ukazuju da glukokortikoidi ne utiču na gensku transkripciju TSH subjedinic (Ahlquist i sar., 1989). Administracija deksametazona kod pacova izaziva supresivni efekat na lučenje TSH, koji je u korelaciji sa dozom i vremenom administracije (Mitsuma i Nogimori, 1982). Kod čoveka, administracija glukokortikoida ne utiče na frekvenciju sekrecije TSH, već smanjuje amplitudu sekrecije i odgovor na egzogeni TRH. Mehanizam direktne supresije glukokortikoida nije potpuno jasan, ali in vitro istraživanja ukazuju na to da je lipokortin-1 (LC-1) verovatni proteinski medijator direktnog supresivnog dejstva glukokortikoida na sekreciju TSH (Taylor i sar., 1995).

Hormon masnog tkiva, leptin, povećava nivo TSH stimulišući sintezu i sekreciju TRH. Egzogeni administracije leptina kod pacova dovodi do povećanja (Ortiga-Carvalho i sar., 2002) dok gladovanje ili imunoneutralizacija leptina dovodi do pada serumske koncentracije TSH. Stimulatorni efekat na TSH takođe imaju i arginin-vasopresin, GLP-1 (glucagon-like peptide-1) i galanin (Ciosek i Stempniak, 1997; Beak i sar., 1996; Arvat i sar., 1995). Peptidi sa autokrinim i parakrinim delovanjem, kao što su neurotensin, supstancija P, epidermalni faktor rasta (EGF), faktor rasta fibroblasta (FGF), citokini IL1 i IL6, takođe utiču na sekreciju TSH. Posebno je značajan neuromedin B, peptid prisutan u visokim koncentracijama u tireotrofima, jer je utvrđeno

da su intraćelijske koncentracije neuromedina B u korelaciji sa nivoom tireoidnih hormona. Utvrđeno je da je neuromedin B autokrini/parakrini peptidni faktor koji inhibira sekreciju TSH i reguliše gensku ekspresiju u tireotrofima, čime ima značajnu ulogu u regulisanju funkcije tiroidne osovine (Oliveira i sar., 2006).

Inhibicija sekrecije TSH nastaje tokom infekcije zbog promene u funkciji hipotalamusa i hipofize izazvane inflamatornim citokinima (van Haasteren i sar., 1994). Inflamatorni citokini (IL1, IL6 i TNF- α) deluju direktno, inhibirajući sekreciju TSH ili indirektno aktiviranjem sekrecije somatostatina (Kennedy i sar., 1995). Smatra se da IL1 ima najveći inhibicioni efekat kod životinja, pri čemu mehanizam delovanja može biti kroz stimulaciju lučenja somatostatina, ali i stimulaciju lokalne aktivnosti DIO2, što dovodi do povećanje nivoa T₃ u adenohipofizi, čime se inhibira dalja sekrecija TSH (Baur i sar., 2000).

U kontekstu sekrecije i efekata TSH hormona, nedavno je otkriven hormon tirostimulin koji je TSH agonist, a po sastavu glikoprotein, a koji ima visok afinitet za TSH receptore. To je nekovalentni heterodimer, formiran od dve glikoproteinske subjedinice, glikoproteina α 2 (GPA2) i glikoproteina β 5 (GPB5) koga primarno luče kortikotrofi adenohipofize (Nakabayashi i sar., 2002). Tirostimulin ima širu tkivnu distribuciju za razliku od TSH i smatra se da ima parakrino delovanje na tkiva koja ekspimiraju TSH receptore (Okada i sar., 2006; Nagasaki i sar., 2006). Utvrđeno je da inflamatorni citokini (TNF- α i IL 1 β) pozitivno regulišu transkripciju GPB5 subjedinice tirostimulina, kroz aktivaciju nuklearnog faktora kapa B (NF-kappaB) (Suzuki i sar., 2009).

2.3.2. Fiziološka uloga

Fiziološka uloga i aktivnost TSH se ostvaruje vezivanjem za TSH receptor. Proteinski kompleks TSH i TSH receptor je ključni faktor u regulaciji, razvoju, rastu i funkciji štitaste žlezde. TSH receptor pripada familiji receptora glikoproteinskih hormona (GPHR – glycoprotein hormone (GPH) receptor) i velikoj superfamiliji G protein-vezanih membranskih receptora (G proteincoupled receptors - GPCRs) (Kaczur i sar., 2002). U familiju GPH receptora spadaju i receptori za FSH (FSHR) i LH (LHR) (Jiang i sar., 2014). Funkcionalne i strukturne specifičnosti u primarnoj strukturi molekula TSH receptora, omogućavaju mu da poseduje strogu specifičnost za svoj

ligand, molekul TSH, pri čemu je mogućnost za vezivanje sa ostalim glikoproteinima svedena na minimum (Szkudlinski i sar., 2002). Minimalna mogućnost nehomologih hormon-receptor interakcija je posledica specifične strukture β subjedinice glikoproteinskih hormona i specifičnosti receptorskog domena glikoproteinskog receptora. Nehomologna interakcija je utvrđena jedino u slučaju visoke koncentracije hormona (Farid i Szkudlinski, 2004). Bovini TSH receptor je transmembranski protein lociran na bazolateralnoj strani tireocita u obliku jednolančanog polipeptida, formiranog od 763 aminokiselina koje uključuju signalnu peptidnu sekvencu od 20 aminokiselina, molekulske mase od 86,4 kDa (Silversides i sar., 1997). Primarna struktura molekula TSHR je relativno konzervativna. Molekularno kloniranje, sekvencioniranje i ekspresija molekula TSHR je pokazala strukturnu sličnost od 91,8% između molekula bovinog TSHR i TSHR svinje kao i 89,5% sličnosti između humanog TSHR i TSHR svinje (Igarashi i Nagata, 2003). Molekul bovinog TSHR sadrži jednu aminokiselinu manje u korespondirajućoj sekvenci u poređenju sa molekulima TSHR pasa, čoveka i pacova (Silversides i sar., 1997).

Polipeptidni lanac TSHR je formiran u tri domena koji formiraju dve subjedinice: A (α) i B (β). A subjedinica uključuje ekstracelularni NH₂ terminalni domen, formiran od 417 aminokiselina, dok B subjedinica uključuje transmembranski serpentinski domen sa 265 aminokiselina koji formiraju sedam transmembranskih domena i kratak intracelularni COOH terminalni domen, formiran od 82 aminokiseline (Farid i Szkudlinski, 2004). Humani TSHR gen je lociran na hromozomu 14 i sadrži 10 egzona. TSH receptor se sintetisuje kao jedinstveni polipeptidni lanac koji je kodiran sa jedne mRNA. Formiranje dve subjedinice je rezultat intramolekularnog cepanja na dva mesta na ekstracelularnom domenu, pri čemu nastaje odvajanje imunogenog C peptida molekulske mase od 5-7 kDa. Intramolekularno cepanje je posredovano aktivnošću enzima ADAM 10 (enzim familije disintegrin i metaloproteinaze), a regulisano nivoom TSH (Kaczur i sar., 2007). Formiranje subjedinice nastaje u kasnoj fazi sinteze molekula na Goldži sistemu ili na ćelijskoj membrani (Tanaka i sar., 1999). Genska ekspresija receptora TSH i prisustvo mRNA za njega su utvrđeni i u ekstratireoidnim tkivima, kao što su ćelije bubrega, testisa, kosti, limfociti, adipociti, retrookularni fibroblasti, žuto telo, nervne ćelije i astrociti (Mengistu i sar., 1994; Crisanti i sar., 2001; Mutinati i sar., 2010). Ekspresija na limfocitima se povezuje sa mogućnošću parakrine i

autokrine regulacije TSH. Ovaj tip regulacije je opisan na intestinalnoj mukozi pri čemu se smatra da TSH poreklom iz enterocita reguliše funkciju enterocita i limfocite epitela, i to kroz receptore za TSH molekule (Wang i sar., 1997).

Aminoterminalni kraj ili ekstracelularni domen je najveći domen TSH receptora i čini polovinu molekulske mase celokupnog receptora (Rapoport i sar., 1998). Ekstracelularni kraj molekula je karakterističan po tome što sadrži 16 repetitivnih mesta bogatih leucinom (LRR - leucine-rich repeat) i 6 potencijalnih sekvenci koje su mesta glikozilacije bogate asparaginom. Asparaginska mesta koja vezuju oligosaharide tokom glikozilacije su značajna u formiranju tercijarne strukture molekula i funkciju receptora (Nagayama i sar., 1998). Glikozilacija je proces koji nastaje tokom posttranslacione modifikacije molekula TSHR i uključuje proces sijalinacije, što utiče na stepen ekspresije molekula TSHR na ćelijskoj membrani (Kursawe i Paschke, 2007). LRR sekvenca na ekstracelularnom domenu ili CFR regija (cysteine-rich flanking region) je ključni segment koji omogućava receptorske modulacije u vezivanju TSH za receptor i inicijaciju aktivacije receptora. Leucin repetitivna sekvenca ili LRR ima tercijarnu strukturu u obliku potkovice. Sekundarna struktura sastoji se od hidrofobnog β lanca koga formiraju konkavne strane LRR sekvence (Enkhbayar i sar., 2004). Karakteristično je to da je LRR primarno mesto vezivanja TSH molekula. U zavisnosti od konformacionih promena u proteinskoj strukturi, ekstracelularni domen može biti sa otvorenom - aktivnom formom i zatvorenom - neaktivnom formom. Jedino otvorena konformacijska forma je aktivna i jedino ona može vezati ligand ili TSH molekul (Davies i sar., 2002). Vezivanjem za CFR regiju na ekstracelularnom domenu, TSH inicira promene u tercijarnoj strukturi molekula TSHR i kovalentnom vezivanju liganda za receptor, čime α subjedinica postaje značajna u aktivaciji signala, a β subjedinica za specifičnost hormona (Smits i sar., 2003; Farid i Szkudlinski, 2004). Na ekstracelularnom domenu, na regionu između LRR sekvence i transmembranskog domena nalazi se zglobni deo (hinge region – HinR) ili specifičan signalni domen (SSD - signaling specificity domain) (Chen i McLachlan, 2010). Ovaj deo (HinR) povezuje LRR deo sa transmembranskim serpentinskim domenom. Aminokiselinske sekvence u HinR imaju specifičan redosled i u ovom regionu se nalaze najveće razlike između tri homologna glikoproteina (Krause i sar., 2012). Zglobni region ekstracelularnog domena ima značajnu ulogu u stabilizaciji liganda i regulaciji aktivnosti receptora, uključujući i

signalnu transdukciju receptora (Jaeschke i sar., 2011). Vezivanje molekula TSH za TSH receptor primarno nastaje ekstracelularnim domenom, ali u vezivanju i aktivaciji receptora značajnu ulogu ima i transmembranski domen (TDM). Ovaj domen je formiran od sedam hidrofobnih transmembranskih segmenata koje su povezani sa tri ekstracelularne i tri intracelularne zavojnice. Transmembranski domen ima ulogu u regulaciji aktivnosti i konformacijskim promenama ekstracelularnog domena TSH receptora, kao i u transdukciji signala nakon vezivanja liganda (Chen i McLachlan, 2010). Zatvorena konformacijska forma ili neaktivni oblik TSH receptora je rezultat elektrostatske interakcije ekstracelularne zavojnice transmembranskog domena i ekstracelularnog domena. Vezivanje liganda je praćeno otvaranjem konformacije, što je rezultat prekida ove interakcije i vezivanja α subjedinice molekula TSH sa ekstracelularnu zavojnicu transmembranskog segmenta. Ova interakcija omogućava stabilizaciju i aktivaciju TSH receptora (Latif i sar., 2014). Intracelularne zavojnice transmembranskog domena imaju značajnu ulogu u signalnoj transdukciji (Chazenbalk i sar., 1990). Transmembranski domen se završava intracelularnim ili karboksilnim domenom.

Efekat TSH je rezultat vezivanja TSH za TSHR i formiranja TSH/TSHR kompleksa. Formiranje TSH/TSHR kompleksa uključuje niz posledičnih događaja, počevši od vezivanja za specifičnu lokaciju na ekstarcelularnom domenu TSHR, konformacionu promenu receptora, interakciju receptora sa G proteinom i strukturne promene G proteina uz aktivaciju signalne kaskade unutar ćelije (Kleinau i sar., 2013). Vezivanje TSHR za G protein ostvaruje se kroz intracelularni karboksilni domen i zavisi od intramolekularnog cepanja molekula TSHR uz aktivnost enzima ADAM 10 (Ciullo i sar., 2003; Kaczur i sar., 2007). Signalna kaskada nakon vezivanja TSH za TSHR uključuje primarno aktiviranje adenilat ciklaze, povećanje koncentracije cAMP i aktivaciju protein kinaze A (PKA) i fosfolipaze C (PLC). Ovaj signalni sistem reguliše prihvatanje joda, transkripciju tiroglobulina, TPO i NIS mRNA koji su značajni za intracelularni metabolizam joda i sintezu tireoidnih hormona (Riedel I sar., 2001; Calebiro i sar., 2010). Drugi signalni sistem aktivacijom G proteina uključuje aktivaciju fosfolipaza C (PLC), aktivaciju inozitol fosfata (IP3) i povećanje intracelularne koncentracije jona Ca^{2+} kroz povećanu mobilizaciju jona iz intracelularnih rezervi. Signalni sistem aktivirane PLC i intracelularnog Ca^{2+} reguliše efluks joda, produkciju

H₂O₂, jodinaciju tiroglobulina (Grasberger i sar., 2007). Vezivanjem TSH za TSH receptor, posebno kod hronične stimulacije receptora, aktivira se JAK/STAT i mTOR/S6K1 signalni mehanizam koji regulišu proces rasta folikularnih ćelija štitaste žlezde (Brewer i sar., 2007). Novija istraživanja ukazuju na to da prolongirana stimulacija receptora sa TSH dovodi do njihove indukovane internalizacije, tj. uvlačenja receptora. U ovom slučaju, utvrđeno je da receptor i dalje inicira signal adenilat ciklaza sistemom intracelularno ali efekat ove aktivacije nije identičan sa membranskom aktivacijom cAMP (Calebiro, 2011).

TSH utiče na rast i morfološke promene štitaste žlezde, metabolizam joda i sintezu tireoidnih hormona unutar štitaste žlezde. TSH ima snažan i brz mitogeni efekat na tireoideu i reguliše rast aktiviranjem JAK/STAT i mTOR/S6K1 signalnog puta i interakcijom sa epidermalnim faktorom rasta (EGF), transformišućim faktorom rasta (TGF-alfa) i faktorom rasta sličnim insulinu (IGF-I) (Brewer i sar., 2007; Duh i Grossman, 1995). Hronična stimulacija sa TSH dovodi do povećanja štitaste žlezde zbog hipertrofije i hiperplazije. TSH ima inhibitorni efekat na apoptozu putem inhibicije ekspresije Fas receptora i povećanja ekspresije Bcl-2 inhibitora apoptoze (Andrikoula i sar., 2001). TSH utiče na morfološke i strukturne promene tireocita (Nielsen i sar., 1985). Pod uticajem TSH dolazi do formiranja mikrovila na apikalnoj membrani tireocita, a tireocitni epitel postaje kolumnarni. Zbog toga, prolongiranom stimulacijom sa TSH dolazi do smanjenja volumena koloida, intenziviranja vezikularnog transporta i aktiviranja lizozomalnog sistema tireocita. TSH reguliše posttranskripcionu aktivaciju i ekspresiju proteinskih transportera joda na bazalnoj membrani tireocita (NIS transporteri) i reguliše sintezu tireoid peroksidaze (TPO) i jodnog transportera na apikalnoj membrani tireocita (Nagayama i sar., 1989; Riedel i sar., 2001). Regulacijom ekspresije jodnih transportera TSH takođe reguliše i jodni metabolizam unutar tireoidee. TSH reguliše ekspresiju gena i transkripcije tiroglobulina, reguliše internalizaciju i proteolizu jodiranog tiroglobulina i sekreciju T₃ i T₄ u cirkulaciju (Van Heuverswyn i sar., 1984; Van den Hove i sar., 2007).

Molekul humanog TSH ima poluvreme raspada u cirkulaciji od oko 50 minuta i njegova koncentracija je u korelaciji sa serumskom koncentracijom tireoidnih hormona (Ridgway i sar., 1974). Sijalinizirani oblik molekula TSH ima produženo vreme poluraspada. Step en sijalinizacije molekula TSH se povećava tokom hipertiroidizma,

što vodi do smanjenja biološke aktivnosti molekula TSH (Dietrich i sar., 2012). Sekretija TSH kod goveda, kao i koncentracija tireoidnih hormona, podložna je cirkadijalnim i ultradijalnim varijacijama i ima pulsativni način sekrecije (Huszenicza i sar., 2002). Merenjem nivoa TSH tokom 24 časa utvrđeno je da se kod goveda pik koncentracije TSH dostiže popodne, što je suprotno od pulsativnog načina sekrecije kod ljudi gde su najviše koncentracije utvrđene tokom noći (Guyot i sar., 2007). Na sekreciju TSH utiču i ambijentalni faktori, ambijentalna temperatura, godišnje doba, način ishrane, sastav i unos hrane i laktacija. Značajni faktor koji utiče na serumsku koncentraciju TSH je dostupnost i unos joda. Visoke koncentracije TSH koje se kreću od 30 do 50 μ U/ml, ustanovili su Cvejić i saradnici (1995) kao rezultat endemičnog nedostatka joda. Vrednosti koncentracije TSH u rasponu od 1,3 - 3,8 - 26,9 μ U/ml ustanovljene su kod klinički zdravih jedinki (Goret i sar., 1974; Guyot i sar., 2007; Paulikova i sar., 2011). Tokom graviditeta placenta je relativno nepropustljiva za molekule TSH poreklom od majke. Placentarni tireotropni protein sve do 90. dana gestacije ima ulogu tirotrpnog hormona, vezujući se za TSH receptore fetalne štitaste žlezde i posredujući u razvoju, maturaciji i preuzimanju joda kod fetusa (Avivi i sar., 1982). Nakon tog perioda može se utvrditi prisustvo tireotropa u fetalnoj hipofizi, a time i početak sekrecije TSH.

2.4. Trijodtironin i tiroksin

2.4.1. Struktura, sinteza i sekrecija

Primarna funkcija štitaste žlezde je biosinteza, skladištenje i sekrecija tireoidnih hormona. Tireociti proizvode dva hormona: L-tiroksin (3, 5, 3', 5'-tetrajodotironin - T₄) i L- trijodtironin (3, 5, 3'-trijodotironin - T₃). Biosinteza tireoidnih hormona regulisana je mehanizmom negativne povratne sprege hipotalamusno-hipofizne osovine tj. uz pomoć TRH iz hipotalamusa i TSH iz hipofize, mehanizmom autoregulacije i zavisi od efikasnog funkcionisanja enzimskih sistema i metabolizma tireocita. Adekvatna dostupnost i odgovarajuće snabdevanje jodom, kao i aktivnost ćelijskih mehanizama za optimalni ćelijski transporta joda imaju ključnu ulogu u biosintezi tireoidnih hormona. Biosinteza tireoidnih hormona nastaje u folikulima tiroidee, kao primarnim funkcionalnim jedinicama štitaste žlezde (Kopp, 2005). Folikul je formiran od jednog

reda folikularnih ćelija koje ograničavaju lumen folikula ispunjenog koloidom u kome se dominantno nalazi glikoprotein tireoglobulin (Arvan i Di Jeso, 2005).

Prekursor sinteze tireoidnih hormona je aminokiselina tirozin, koja se nalazi u obliku tirozinskog ostatka na molekulu tireoglobulina (Mansourian, 2011). Tiroglobulin (Tg) je polipeptidni matriks neophodan za sintezu trijodotironina (T_3) i tiroksina (T_4) i skladištenje neaktivnih oblika tireoidnih hormona i joda (Lamas i sar., 1974). Osnovna strukturalna jedinica tireoidnih hormona je difenil-eter, tironin koji jodinacijom sa 4 atoma joda na pozicijama 3,5,3' i 5' daje T_4 ili jodinacijom na pozicijama 3,5 i 3' daje T_3 . Tiroglobulin je homodimerni glikopolipeptid sa molekulskom masom od 660 kDa, koga sintetišu i sekretuju tireociti. Ekspresija gena za Tg i sinteza Tg u tireocitima je pozitivno regulisana tireotropinom kroz TSH receptore i intraćelijsko moduliranje na nivou cAMP (Van Heuverswyn i sar., 1984; Van den Hove i sar., 2007). Transkripciju Tg regulišu transkripcioni faktori koje se vezuju za genske sekvence Tg promotera (Berg i sar., 1997). Tg je izgrađen iz dve polipeptidne subjedinice sa približno 2700 aminokiselina za svaku subjedinicu i oko 123 tirozinskih rezidua od koje je svaka potencijalno mesto za vezivanje joda. Nakon translacije, posttranslacione modifikacije molekula Tg odvijaju se u endoplazmatičnom retikulumu, Golđi aparatu i apikalnoj membrani folikularnih ćelija, a obuhvataju niz procesa kao što su glikolizacija, konformaciono sazrevanje i homodimerizaciju, formiranje disulfidne veze između subjedinica i stabilnost i jodinaciju molekula Tg (Kim i Arvan, 1999; Desphande i Venkatesh, 1999). Na apikalnoj membrani tireocita nastaje kovalentno vezivanje joda, t.j. enzimska jodinacija tirozinskog ostatka na molekulu Tg pri čemu se formiraju neaktivni tirozinski prekursori, monojodtirozin (MIT) i dijodtirozin (DIT), čijim kasnijim udruživanjem nastaju T_3 i T_4 .

Inicijalni proces u biosintezi tireoidnih hormona je preuzimanje joda od tireocita. Ćelijsko preuzimanje nastaje aktivnim transportom, pri čemu se održava stalni koncentracijski gradient i jod ulazi u unutrašnjost ćelije suprotno gradijentu koncentracije. Održavanje Na^+ gradijenta u unutrašnjosti tirocita, koji je i pokretačka snaga jodnog influksa, ostvaruje se uz učešće plazma-membranske Na^+-K^+ ATP-aze. Aktivni transport joda se održava uz pomoć ključnog proteina za preuzimanje ili influks joda, a to je Na/I simporter (NIS) ili SLC5A5, a koji je član familije natrijum/glukoza kotransportera (Dohan i sar., 2003). NIS je integralni membranski glikoprotein smešten

na bazolateralnoj strani tirocita i ima visok afinitet za jod. (Dai i sar., 1996). Humani NIS formiran je od 643 aminokiseline i ima molekulska masu od 70-90kDa (Spitzweg i Morris, 2002). Primarna struktura molekula formirana je od 13 transmembranskih domena i sadrži ekstracelularni amino kraj, citoplazmatski karboksilni kraj i tri potencijalna mesta glikozilacije (Levy i sar., 1998). Mehanizam transporta joda se bazira na modelu prema kome se jon Na^+ vezuje za transporter koji u prisustvu joda formira kompleks i nakon toga prenosi jod i dva jona Na^+ u unutrašnjost tirocita. Ovaj mehanizam je direktno regulisan tirootropinom. TSH stimuliše prihvatanje i nakupljanje joda u tireocitima putem pozitivno regulisane ekspresije NIS transportera i mRNA za transporter aktivirajući cAMP signalni put (Weiss i sar., 1984). Pored regulacije transkripcije i biosinteze molekula NIS, TSH utiče i na aktivnost NIS transportera putem posttranskripcione modulacije. Pod uticajem TSH dolazi do aktivacije NIS transportera i lociranja NIS molekula na bazolateralnoj membrani tirocita. Niske koncentracije TSH dovode do skraćivanja poluživota molekula NIS i internalizacije u citoplazmu, pri čemu dolazi do smanjenje influksa joda u ćelije tiroidee (Riedel i sar., 2001). Fiziološke koncentracije Tg moduliraju stimulatorni efekat TSH na ekspresiju i aktivnost NIS transportera t.j. Tg je deo autoregulatornog sistema koji reguliše funkciju i aktivnost folikularnih ćelija (Suzuki i sar., 1999). Pored toga što NIS ima veliki afinitet prema jodu, on može transportovati i druge jone, velike anjone, kao što su tiocijanat i perhlorat, a koji mogu inhibirati akumulaciju joda u tiroidne ćelije preko kompeticije sa jodom, što je i osnova njihovog antitireoidnog efekta. Perhlorat je 10 do 100 puta potentniji od tiocijanata u inhibiciji akumulacije joda (Wolff, 1998; Van Sande i sar., 2003). Jak negativan efekat na ekspresiju NIS transportera i smanjenje intraćelijske akumulacije joda u in vitro uslovima imaju T_3 i deksametazon, dok metamizol i propiltiouracil (PTU) imaju znatno slabiji negativni efekat u odnosu na T_3 i deksametazon (Spitzweg i sar., 1999). Citokini, IL-6, IL-1 α , TNF- α , IFN γ i IL-1 β u in vitro uslovima smanjuju ili inhibiraju efekat ekspresije NIS mRNA i inhibiraju intraćelijsku akumulaciju joda (Spitzweg i sar., 1999).

Transport joda u lumen folikula, pored aktivnog transporta NIS transporterom na bazolateralnoj strani tirocita, uključuje i pasivan transport kroz apikalnu membranu pomoću proteinskog transportera pendrina (Yoshida i sar., 2002). Pendrin je hidrofoban membranski glikoprotein formiran od 780 aminokiselina i molekulske mase od 110-115

kDa. Ima tri potencijalna mesta glikozilacije i pripada SLC familiji proteina (SLC26A4). Tercijarna struktura pendrina ima 12 transmembranskih domena sa oba amino i karboksilna kraja u citoplazmi. Pendrin je lociran na apikalnoj (luminalnoj) membrani tireocita i predstavlja Cl-/J- razmenjivač koji omogućava jodni efluks t.j. transport joda u lumen folikula (Bizhanova i Kopp, 2009). Ekspresija, translokacija na apikalnu membranu tireocita i aktivnost pendrina je takođe pozitivno regulisana sa TSH. Stimulacija translokacije pendrina ostvaruje se i dejstvom insulina na tireocite (Muscella i sar., 2008). Pendrin nije jedini transporter joda na apikalnoj membrani tireocita, jer se transport joda ostvaruje i transportnim proteinima CLC5, CFTR i SLC26A7, koji omogućuju apikalni transport joda (Twyffels i sar., 2011). Novija istraživanja ukazuju na to da je transportni protein Anoktamin-1 (ANO-1), lociran na apikalnoj membrani tireocita, takođe značajan transporter joda i smatra se odgovornim za transport najvećeg dela joda prema lumenu folikula (Twyffels i sar., 2014).

Oksidacija i organifikacija joda je sledeći proces biosinteze tireoidnih hormona. Oksidacija joda t.j. aktivacija iodida (I^-) do molekularnog joda (I_2) je proces koji se odvija uz učešće enzima tireoperoksidaze (TPO), koja koristi vodonik peroksid (H_2O_2) kao supstrat oksidacije. TPO je integralni membranski glikoprotein lociran na apikalnoj membrani tireocita. Polipeptidni lanac je formiran od 933 aminokiseline i sadrži veliki ekstracelularni domen sa ukupno 845 aminokiselinskih ostataka i mali intraćelijski domen od 60 aminokiselina (Magnusson i sar., 1987). Aktivnost TPO enzima je uslovljena prisustvom prostetične grupe hem (fero-protoporfirin IX) (Ohtaki i sar., 1981). Kod čoveka su utvrđene dve izoforme enzima TPO, od kojih je TPO1 veći molekul koji sadrži hem i aktivan je, dok je TPO2 izoforma sa manjim brojem aminokiselina, koja je neaktivna (Gardas i sar., 1997). Sinteza molekula TPO uključuje i posttranslacione modifikacije: glikozilaciju, inkorporaciju hema i strukturno sazrevanje sa formiranjem dimera. Početni proces glikozilacije odvija se na membrani endoplazmatskog retikuluma, a završna glikozilacija na Goldži aparatu, sa ukupno 5 potencijalnih mesta glikozilacije (Rawitch i sar., 1992). Proces glikozilacije definiše tercijerni oblik molekula i značajan je za transport i aktivnost enzima (Fayadat i sar., 1998). U Goldži aparatu molekul TPO se pakuje u transportne vezikule i transportuje do apikalne membrane tireocita, da bi nakon spajanja transportne vezikule za apikalnom membranom tireocita došlo do eksprimiranja katalitičkih mesta molekula TPO prema

folikularnom lumenu (Kuliawat i sar., 2005). Regulacija biosinteze, transporta i apikalna ekspresija TPO enzima je direktno regulisana sa TSH i intraćelijskom koncentracijom joda. Istraživanjima na ćelijama tiroidee svinja utvrđeno je da TSH ima stimulatorni efekat na ekspresiju i transport TPO molekula, a da visoke koncentracije joda smanjuju nivo enzima (Penel i sar., 1998).

TPO je katalizator oksidacije joda koji omogućava da se jedino molekularni jod kovalentno veže za tirozinske ostatke tireoglobulina. Time nastaje organifikacija joda. Supstrat oksidacije joda je H_2O_2 koga generišu tiroidna hem peroksidaza t.j. NADPH oksidaza (NOX) ili dualna oksidaza (DUOX) (Song i sar., 2007). DUOX je glikoflavoprotein oksidoreduktaza koji je Ca^{2+} /NADPH-zavistan sistem i generiše H_2O_2 funkcionalno udružen sa TPO (Ameziane-El-Hassani i sar., 2005). Utvrđena je tkivna specifičnost enzima dualne oksidaze, i to tako da dominantna ekspresija na tirocitu ima izoformni oblik DUOX2 (Moreno i sar., 2002). DUOX2 je protein sa 1548 aminokiselina i 7 transmembranskih domena (NADPH vezujući domen, FAD-vezujući domen, hem vezujući domen, Ca zavisani domen i peroksidaza domen). Aktivacija DUOX2 enzima zahteva prisustvo faktora sazrevanja nazvanog DUOXA2, koji utiče na sazrevanje i translokaciju funkcionalnog enzima DUOX2 na membranu tirocita (Grasberger i Refetoff, 2006). Lokalizacija DUOX2 enzima na apikalnoj membrani tirocita je takva da je u neposrednoj blizini enzima TPO, zbog čega se formira kompleks koji omogućava regulaciju generisanja H_2O_2 i aktivnost TPO (Fortunato i sar., 2010). Utvrđeno je da TSH nije primarni regulator ekspresije i aktivnosti DUOX2/DUOXA2 enzima. Tireoglobulin je taj koji suprimira nivo ekspresije enzima i smanjuje generisanje H_2O_2 (Yoshihara i sar., 2012). Istraživanja na humanim tirocitima su pokazala da medijatori inflamacije mogu modulirati ekspresiju i aktivnost DUOX enzimskog sistema (Raad i sar., 2013).

Kovalentno vezivanje joda za tirozinske ostatke na molekulu Tg ili proces organifikacije joda nastaje aktivnošću TPO u prisustvu H_2O_2 . Jodiranje Tg nastaje na apikalnoj membrani tirocita pri čemu se formiraju MIT (monojodtirozin) i DIT (dijodtirozin) (Virion i sar., 1981). Molekul Tg sadrži oko 123 tirozinska ostatka, ali samo trećina od ukupnog broja je jodirana tako da molekul Tg u ovoj fazi sadrži oko 1% kovalentno vezanog joda. Sledeća faza je sparivanje dva susedna jodotirozinska ostatka i formiranje jodotironina t.j. sparivanje dva molekula DITa formira se T_4 dok se

sparivanjem molekula MIT i DIT formira T_3 . Proces sparivanja počinje katalitičkom reakcijom enzima TPO, odnosno oksidacijom jodotirozinskih ostataka. Ovaj proces je zavisian od strukturne konformacije molekula Tg (Cahnmann i sar., 1977; Virion i sar., 1981; Mansourian, 2011). Formiranje jodotironina se zasniva na principu formiranja veze između jodofenol tirozina, kao donora, i hidroksilne grupe tirozina, kao akceptora. Nakon cepanja intermedijarnog produkta nastaje jodtironin (T_3 ili T_4) sa jedne strane i dehidroalaninski ostatak na peptidnom lancu sa druge strane. Proces organifikacije joda i sparivanje tirozinskih ostataka pozitivno reguliše TSH. Koncentracija jodida može modulirati proces sparivanja i sinteze. Višak jodida inhibira proces sparivanja jodotirozinskih ostataka kroz inhibiciju aktivnosti TPO i sistem generiranja H_2O_2 , ali nedostatak jodida takođe utiče na sintezu efektivne količine tireoidnog hormona i smanjuje odnos proporcije tiroksina i trijodtironina sintetisanih u tiroidei (Wildberger sar., 1983).

T_3 i T_4 , koji su deo molekula Tg, uskladišteni u koloidu folikula su neaktivni. Proces sekrecije tireoidnih hormona, uključuje vezikularnu internalizaciju molekula Tg u tireocite sa apikalne membrane i proces enzimske proteolize lizosomalnim enzimima (Rousset i Mornex., 1991). Proces internalizacije Tg je posredovan od receptora za Tg koji se nalazi na apikalnoj membrani tireocita, nazvanog megalin (Marinò i McCluskey, 2000a) Megalin je membranski protein koji pripada familiji LDL (low density lipoprotein) receptora i njegova ekspresija je, kao i sam proces internalizacije, pozitivno regulisana sa TSH (Marinò i sar., 2000b). Nakon vezivanja Tg za megalin nastaje proces internalizacije sa formiranjem vezikula, a kasnije i endozoma. Jedan mali deo Tg, i to onaj koji sadrži manji broj formiranih tireoidnih prekursora, nakon internalizacije pomoću receptora megalina i vezikularnog transporta, prolazi kroz ćeliju i napušta je sa bazolateralne membrane u cirkulaciju (Marinò i sar., 2000c). Endozomi tireocita u kojima se nalazi Tg, spajaju se sa lizozomima formirajući fagolizozom, u kome se odvija proces proteolitičkog cepanja molekule Tg (Dunn i sar., 1991). Enzimi koji hidroliziraju Tg su endo i egzopeptidaze (katepsin B, K i L) dipeptidaza I i II, glikohidrolaza, fosfataza, sulfataza i drugi. Nakon hidrolize i oslobađanja T_3 i T_4 , aktivni hormoni napuštaju lizosomalne vezikule i preko bazolateralne membrane tirocita prelaze u cirkulaciju.

2.4.2. Fiziološka uloga

U cirkulaciji nalazi se nekoliko oblika jodotironina i njihovih derivata. Od svih oblika, T_4 je dominantni oblik koga direktno luči štitasta žlezda, dok oko 80% koncentracije T_3 potiče iz perifernih tkiva i dobija se enzimskom dejodinacijom (Bianco i sar., 2002). Preostali jodotironini, kao što su reverzni T_3 (rT_3), diiodotironin (T_2) i ostali derivati t.j. produkti glukoronidacije (T_4G) i sulfatacije (T_4S), generišu se u perifernim tkivima i u serumu se nalaze u tragovima (Wu i sar., 2005).

Tiroidni hormoni su hidrofobni molekuli i u cirkulaciji se uglavnom nalaze reverzibilno vezani za serumske proteine. Kod goveda slobodna frakcija T_4 čini približno 0,027 % u odnosu na ukupni T_4 , dok slobodni T_3 čini 0,3% ukupnog T_3 (Nixon i sar., 1988). Biološka aktivnost i metabolička sudbina tireoidnih hormona nakon sekrecije zavisi od dostupnosti slobodnog oblika T_4 i T_3 perifernim tkivima. Ukupna koncentracija tireoidnih hormona u cirkulaciji je proporcionalna koncentracijama vezujućih transportnih proteina za tireoidne hormone, tako da se održava adekvatan nivo koncentracije slobodnih hormona (Shuler, 2000). Vezivanjem za serumske proteine, omogućava se skladištenje hormona, a time i homogena distribucija T_4 i T_3 u tkivima (Mendel i sar., 1987), kao i ekonomičnost u potrošnji joda smanjenjem njegove eliminacije putem urina. Glavni transportni proteini za tiroidne hormone su: globulin koj vezuje tiroksin (TBG), prealbumin koji vezuje tiroksin (TBPA) ili transtiretrin (TTR), serumski albumin i lipoproteini (Hulbert, 2000). Distribucija i afinitet vezivanja za tireoidne hormone je različit kod različitih transportnih proteina (Larsson i sar., 1985).

Dominantni serumski protein za koji se vezuju tiroidni hormoni je TBG, koji ima veliki afinitet vezivanja za tiroidne hormone i za koji se vezuje oko 70% ukupnih hormona u cirkulaciji, odnosno 65% od ukupnog T_4 i 80% od ukupnog T_3 (Hulbert, 2000). Primarna struktura molekula TBG je relativno konzervativna i pokazuje više od 80% sličnosti upoređujući humane, bovine i molekule TBG kod svinja, sa više od 95% sličnosti u domenu vezivanja za ligand (Janssen i sar., 2002). TBG je glikoprotein molekulske mase 45 kDa koji se sintetiše u jetri kao jednolančani polipeptid i sadrži 20% ugljenohidratne komponente. Molekul TBG ima jedno mesto za vezivanje, sa većim afinitetom prema T_4 u odnosu na T_3 . Afinitet vezivanja zavisi od konformacione promene molekula TBG i stepena glikozilacije. Posttranslaciona glikozilacija je

značajna za sazrevanje, sekreciju i stabilnost molekula (Murata i sar., 1986). Naime, ona povećava klirens molekula, dok stepen sijalinizacije usporava klirens inhibiranjem preuzimanja glikoproteina u jetri (Ain i sar., 1987). Koncentracija TBG i afinitet vezivanja su u korelaciji sa koncentracijom tireoidnih hormona (Shaw i sar., 1975; Lin i sar., 1989). Indukovani hipotireoidizam kod neonatalnih pacova dovodi do povećanja afiniteta TBG za tiroksin, dok je indukovani hipertireoidizam pokazao suprotni efekat (Savu i sar., 1989).

Prealbumin koji vezuje tiroksin (TBPA) ili transtiretrin (TTR) je homotetramer formiran od 4 identična polipeptidna lanca sa molekulskom masom od 55kDa, koji ne podleže glikolizaciji. TTR molekularni kompleks takođe vezuje i retinol (Hamilton i Benston, 2001). Afinitet vezivanja za tiroidne hormone je manji u poređenju sa TBG, jer vezuje oko 15% T_4 i 9% T_3 . U uslovima visoke koncentracije T_4 molekul TTR vezuje jedan molekul T_4 sa visokim, a drugi sa slabijim afinitetom (McCammon i sar., 2002). TTR je proteinski transporter tireoidnih hormona u plazmi i primarni transporter T_4 u cerebrospinalnoj tečnosti (Dickson i sar., 1986).

Serumski albumini (TBA) imaju slabiji afinitet prema vezivanju tireoidnih hormona u odnosu na TBG i TTR, i pored toga što se nalaze se u najvećoj koncentraciji u serumu (Hulbert, 2000). Promene koncentracije serumskih albumina nemaju veliki uticaj na koncentraciju tireoidnih hormona, i promene u koncentraciji tireoidnih hormona su moguće jedino ako postoji pad koncentracije i ostalih proteinskih transportera. TBA nisu specifični za tireoidne hormone i primarno vezuju druge supstance, tako da vezivanje masnih kiselina i jona hlora smanjuje afinitet prema tireoidnim hormonima (Feldt-Rasmussen i Rasmussen, 2007; Refetoff, 2012).

Tireoidni hormoni se, pored plazma proteina, vezuju različitim afinitetom i za sve frakcije lipoproteina. Najveći afinitet imaju frakcije lipoproteina visoke gustine (HDL - high density lipoproteins) (Benvenga i sar., 1992). Tireoidni status utiče na distribuciju vezivanja tireoidnih hormona na HDL subfrakcije. Za HDL je vezano oko 3% T_4 i 6% T_3 (Benvenga i sar., 2001). Kod pasa je oko 11% tireoidnih hormona vezano za HDL (Larsson i Pettersson, 1987).

Biološka aktivnost tireoidnih hormona je primarno određena intraćelijskom koncentracijom T_3 kao biološki aktivnog oblika tireoidnih hormona. Koncentracija T_3 unutar ćelije zavisi od dostupnosti T_3 i T_4 u cirkulaciji, ekspresije i aktivnosti ćelijskih

membranskih transportera i aktivnosti enzima dejodinaza. Transport hormona je aktivan proces koji se odvija kroz dva stereospecifična membranska mesta na površini ćelije, različita po afinitetu vezivanja i transporta hormona. Jedino je ćelijski ulaz kroz mesta sa visokim afinitetom aktivan proces zavisn od dostupnosti energije i koncentracije jona Na^+ , a zasniva se na membranskoj translokaciji hormona unutar ćelije (Hennemann i sar., 2001). Membranski transport tireoidnih hormona u ćelije ostvaruje se putem specifičnih membranskih transportera (Fresema i sar., 2005). Kod čoveka i pacova identifikovano je nekoliko transportera za tireoidne hormone koji se mogu podeliti u dve grupe: organske anjonske i aminokiselinske transportere (Fresema i sar., 2005).

Organski anjonski transporteri, uključuju 2 familije: NTCP (Na^+ /tauroholate-cotransporting polipeptide) transporter koji je karakterističan za jetru i OATP transporter (organic anion co-transporting polypeptide). OTAP transporteri su velika familija homolognih proteina koje transportiraju jodotironine sa preferencijom za T_4 i imaju široku tkivnu distribuciju (Hagenbuch i sar., 2004). Karakterističan je OTAP1C1 transporter, koji se nalazi u kapilarima mozga i omogućava transport T_4 kroz moždano-krvnu barijeru. Ekspresija ovog transportera regulisana je koncentracijom tireoidnih hormona (Sugiyama i sar., 2003; Van der Deure i sar., 2008).

Tri tipa aminokiselinskih transportera, L tip (LAT-Ltype amino acid transporter), T tip (TAT-T type amino acid transporter) i rB tip transportera (rBAT-related to basic amino acid transport) su efikasni jodotironinski transporteri (Fresema i sar., 2005). LAT1 i LAT2 su karakteristični za internalizaciju jodotironina u ćelije i nalaze se na ćelijama placente, slezene, intestinalnog sistema i kapilara mozga (Kinne i sar., 2011). T tip aminokiselinskog transportera ili MCT10, pripada familiji MCT (monocarboxylate transporter) transportera. Karakteristično je da MCT10 ima najveću homologiju sa MCT8 transporterom. Za oba MCT transportera se smatra da su transporteri za tireoidne hormone. MCT8 je specifičan transporter za tireoidne hormone na moždano-krvnoj barijeri i ćelijama moždanog tkiva. MCT8 transporter tanacita i astrocita u moždanom tkivu omogućava i izlazak T_3 nakon enzimske aktivacije T_4 u ovim ćelijama, tako da je T_3 dostupan za transport u neurone opet kroz MCT8 transporter. MCT8 transportuje T_4 intenzivnije i lakše u odnosu na MCT10 koji je specifičniji za T_3 . Tkivna distribucija MCT10 nije specifična za moždano tkivo i

njegova ekspresija je utvrđena i na ćelijama srca, jetre, bubrega i digestivnog aparata (Kinne i sar., 2010; Karapanou i Papadimitriou, 2011).

Kod većine ćelija, 90% ukupnog T_3 se nalazi u citosolu, a jedini izuzetak je hipofiza gde se 50% ukupnog T_3 nalazi u jedru. Distribucija i transport tireoidnih hormona unutar ćelije je takođe omogućen transportnim proteinima. CTBP (Cytosolic 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T_3)-binding protein) je intracelularni protein koji vezuje molekul T_3 i nalazi se na više mesta unutar moždanog tkiva (Nishii i sar., 1993).

Glavni metabolički put i regulacija aktivnost tireoidnih hormona je enzimski posredovana monodejodinacija spoljašnjeg prstena (5') T_4 i njegova aktivacija u T_3 kao aktivni oblik. Proces enzimske dejodinacije je mehanizam koji reguliše homeostaza i lokalna kontrolna aktivnost tireoidnih hormona. Enzimska dejodinacija je katalizirana enzimima iz familije jodotironin dejodinaza koje obuhvataju tri enzima. To su jodotironin dejodinaza tipa 1 (DIO1) i jodotironin dejodinaza tipa 2 (DIO2) koji kataliziraju proces dejodinacije spoljašnjeg prstena tiroksina (vrše 5' dejodinaciju) pri čemu se dobija aktivan trijodtironin ili T_3 . Treći enzim je dejodinaza tipa 3 (DIO3), koja dejodinacijom unutrašnjeg prstena tiroksina daje reverzni tip T_3 (rT_3) ili neaktivan oblik tireoidnih hormona (St Germain i Galton, 1997 ; Bianco i sar., 2002).

Jodotironin dejodinaze su selenoproteini, homodimeri, molekulske mase 29-33 kDa i molekularne sličnosti oko 50%. Posttranslaciona dimerizacija molekula je značajna za katalitičku aktivnost dejodinaze (Curcio-Morelli i sar., 2003). U strukturi dejodinaza karakteristično je prisustvo selenocisteinskog katalitičkog centra visoke konzervativnosti sa dva histidinska ostatka formirana od 15 aminokiselina i prisustvo transmembranskog domena kod sva tri tipa dejodinaza (Bianco i sar., 2002; Gereben i sar., 2008). Nukleofilne osobine selenocisteinskog katalitičkog centra značajne su za katalizaciju oksidoreduktivnih reakcija, u koje je uključena i jodotironinska dejodinacija. Funkcionalna specifičnost dejodinaza tokom održavanja tireoidne unutarćelijske homeostaze je određena i celularnom lokalizacijom dejodinaze. Naime DIO1 i DIO3 su locirane na plazma membrani, dok se DIO2 nalazi na endoplazmatičnom retikulumu (Bianco i Larsen, 2005).

Dejodinaza tipa 1 je tioredoksin, integralni membranski protein sa jednim transmembranskim domenom, N terminalnim krajem i globularnim domenom (Callebaut i sar., 2003). Globularni domen i katalitički centar su okrenuti prema citosolu

(Baqui i sar., 2000). Smatra se da ovakav vid ćelijske lokalizacije doprinosi tome da se DIO1 smatra glavnim proizvođačem T_3 u plazmi. Tkivna distribucija DIO1 obuhvata mnoga tkiva, ali se dominantno nalazi u jetri, bubrezima, hipofizi, tiroidei, intestinalnom sistemu, placenti i CNS kod pacova (Bianco i sar., 2002). DIO1 je jedina dejodinaza koji katalizuje jodotironin dejodinaciju i spoljnog (5' dejodinacija) i unutrašnjog prstena (5' dejodinacija) (Berry i sar., 1991). Reakcija dejodinacije katalizovana dejodinazom tip 1 ima „ping-pong“ kinetiku, u kojoj su uključena dva supstrata od kojih je prvi jodotironin, a drugi je, najverovatnije, tiolni kofaktor ditiotreitol (DTT) (Leonard i Rosenberg, 1980; Berry i sar., 1991). Reakcija dejodinacije odvija se u dve faze: transfer J^+ od supstrata do selenil (Se^-) anjona selenocisteina, pri čemu nastaje formiranje intermedijarnog proizvoda, koji se sa tiolnim kofaktorom brzo redukuje u selenil jodid (SeJ) kompleks. Dejodinacija posredovana sa dejodinazom tipa 1 ima tri puta veću kinetičku konstantu za supstrat od dejodinacija posredovanih dejodinazama tipa 2 i 3 za isti supstrat (Otten i sar., 1983). I pored toga što je primarni supstrat dejodinacije T_4 , uz produkciju T_3 i rT_3 , DIO1 ima preferenciju za rT_3 (5' dejodinacija) i T_3S (5' dejodinacija) (Toyoda i sar., 1997). Reakcije dejodinacije koje su katalizirane sa DIO1 mogu biti inhibirane dejstvom PTU (6-n-propyl-2-thiouracil). Dejodinaza tip 1 je vrlo osetljiva na dejstvo PTU, za razliku od ostala dva tipa dejodinaza. Mehanizam inhibicije zasniva se na kompetitivnom vezivanju za intermedijerni produkt selenojodid, pri čemu se stvara ireverzibilni kompleks, enzim-Se-S-PTU. Time je onemogućena aktivnost tiolnog kofaktora i redukcija SeJ kompleksa (Kuiper i sar., 2005).

Sintezu DIO1 regulišu različiti hormonalni, nutritivni i razvojni faktori, ali najpotentniji faktor su tireoidni hormoni. Istraživanja kod pacova i čoveka su pokazala da T_3 pozitivno reguliše ekspresiju DIO1 gena, na transkripcionom nivou, vezivanjem za dva TRE kompleksa (TRE1 i TRE2 - thyroid response element 1 i 2) na promotorskom regionu (Toyoda i sar., 1995; Zhang i sar., 1998). DIO1 promotorski region sadrži i domen (retinoic acid (RA) response element) koji aktivira $TR\beta$ (beta receptor tireoidnog hormona) za koji se smatra da je primarno značajan za stimulaciju transkripcije mRNK za DIO1 uz pomoć T_3 (Ammia i sar., 2001). Hepatocitni nuklearni faktor 4α (HNF 4α) takođe pozitivno reguliše genske promotore DIO1, i to uz kooperativno delovanje sa KLF9 (Krüppel-like transcription factor 9) faktorom, čija je ekspresija, najverovatnije, pozitivno regulisana sa T_3 . Ovim mehanizmom objašnjava se

indirektni pozitivni T_3 efekat na sintezu DIO1 (Ohguchi i sar., 2008). TSH ima pozitivni efekat na sintezu DIO1 kroz cAMP signalni put, a smatra se i da hormon rasta (GH) povećava aktivnost DIO1 i smanjuje aktivnost DIO3, povećavajući na taj način odnos $T_3:T_4$ u plazmi (Darras i sar., 1992; Beech i sar., 1995). Istraživanja efekata kortikosteroida na ćelije pacova i čoveka pokazala su različite efekte. Utvrđeno je da kortikosteroidi smanjuju nivo DIO1 u hepatocitima pacova, dok deksametazon slabo povećava nivo mRNA za DIO1 (Davies i sar., 1996). Davanje kortikosteroida dovodi do pada odnosa $T_3:T_4$ u cirkulaciji, što se objašnjava mogućnošću inhibicije konverzije T_4 u T_3 (Cavalieri i sar., 1984). Sa druge strane, istraživanja ukazuju na to da kortikosteroidi povećavaju aktivnost DIO3, a time i povećavaju klirens T_3 putem 5 dejodinacije, dovodeći do povećanja koncentracije rT_3 (LoPresti i sar., 1989). Značajna inhibicija sinteze DIO1 i smanjena ekspresija mRNA za DIO1 je utvrđena na kulturama ćelija pod uticajem $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ i $INF \gamma$, što je bilo potvrđeno i u in vivo ogledima kod pacova, gde je nakon administracije citokina utvrđen pad odnosa $T_3:T_4$ (Pekary i sar., 1994).

Kod pacova je tokom fetalnog perioda i nakon rađanja karakterističan relativno nizak odnos $T_3:T_4$ i niska aktivnost DIO1 (Abuid i sar., 1973). Tokom neonatalnog perioda, nekoliko sati nakon rađanja, odnos $T_3:T_4$, se povećava kao rezultat povećanja koncentracije TSH, a time i tireoidnih hormona i povećanje ekspresije mRNA za DIO1 i DIO2. Relativno brzo tokom neonatalnog perioda nastaje povećanje aktivnosti DIO1 u mnogim tkivima (jetri, intestinalnom sistemu, bubrezima), što omogućava održavanje optimalne koncentracije T_3 u plazmi (Bates i sar., 1999). Povećanje tkivne ekspresije mRNA za DIO1, povećanje koncentracije T_3 u serumu kao i smanjenje klirensa T_3 tokom neonatalnog perioda kod novorođene jagnjadi takođe ukazuje da sazrevanje dejodinazne aktivnosti tokom kasne faze graviditeta i neonatalnog perioda nastaje pod uticajem T_3 (Forhead i sar., 2006).

Deiodinaza tipa 2 katalizira dejodinaciju spoljnog prstena (5' dejodinacija) i smatra se da je glavni enzim koji aktivira T_4 na nivou tkiva, za njegove lokalne potrebe. DIO2 takođe katalizira i dejodinaciju spoljnog prstena rT_3 , pri čemu se dobija 3,3'dijodtironin (T_2). DIO2 je membranski protein koji se nalazi na membrani endoplazmatičkog retikuluma (ER), odnosno unutar ćelije, što objašnjava njenu neosetljivost na delovanje PTU. Molekul DIO2 sadrži transmembranski domen, pri

čemu se NH₂ terminalni kraj nalazi u lumenu ER, a COOH terminalni kraj u citosolu. Globularni segment i katalitički centar molekula se nalaze prema citosolu (Baqui i sar., 2000; Zeöld i sar., 2006). Za molekul DIO2 je karakterističan potencijal dimerizacije transmembranskog i globularnog domena koji je značajan za aktivnost enzima (Sagar i sar., 2007). DIO2 ima relativno kratko vreme poluraspada (oko 45 minuta), pri čemu podleže ubikvitaciji i proteazomskom mehanizmu deaktivacije enzima, procesu koji je ubrzan interakcijom sa T₄ (Gereben i sar., 2000). Suprotno od DIO1, DIO2 je neosetljiva na PTU (Salvatore, 1996). Unutarćelijska lokalizacija DIO2 u blizini jedra omogućava da lokalno stvoreni T₃ ima bolji pristup do jedra. Tako se DIO2 smatra glavnim enzimom koji obezbeđuje optimalne koncentracije T₃ unutar ćelije. Dejodinaza 2 ima široku tkivnu distribuciju i specifična je za različita tkiva. Posebno je značajno prisustvo DIO2 u ćelijama mozga, hipofize, mrkog masnog tkiva, placente i tiroidee (Arrojo i sar., 2011). Analizom genske ekspresije mRNA za DIO2 kod goveda, utvrđena je njena najveća ekspresija u mlečnoj žlezdi, tiroidei, hipofizi, hipotalamusu, bubrezima i plućima (Connor i sar., 2005). Ekspresija DIO2 u tkivima je specifično regulisana i zavisi od tipa ćelije. Regulacija uključuje kombinacije mehanizma koji regulišu gensku transkripciju, posttranskripcione mehanizme regulacije stabilnosti mRNA za DIO2 i posttranslacione mehanizme ubikvitacije i proteazomske degradacije enzima (Bianco i Kim, 2006).

Ciklični adenozin monofsfat (cAMP) i adrenergični signalni put su dominantni mehanizmi koji regulišu transkripciju i aktivnost DIO2 (Bartha i sar., 2000). DIO2 ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze tireoidne osovine. Na tireotrofima adenohipofize, ekspresija i aktivnost DIO2 i tireoidnog receptora TRβ₂, mehanizmom povratne sprege regulišu ekspresiju TSH β gena. Ekspresija DIO2 na tanacitima i koncentracija T₄ u cerebrospinalnoj tečnosti, parakrinim mehanizmom utiče na regulaciju sinteze TRH (Arrojo i sar., 2013). Adrenergična stimulacija i aktivacija β adrenergičnih receptora na ćelijama mrkog masnog tkiva tokom izlaganja hladnoći dovodi do povećanja unutarćelijske proizvodnje cAMP i protein kinaze A, što dovodi do povećanja nivoa mRNA za DIO2 i aktivnosti DIO2 (Carvalho i sar., 1991). Ovim mehanizmom nastaje povećana konverzija T₄ u T₃ i unutarjedarna saturacija receptora tireoidnih hormona, značajnih za ekspresiju i aktivnost UCP1 proteina (uncoupling protein 1) u mrkom masnom tkivu (Ribeiro i sar., 2010). Potvrđivanjem prisustva TSH

receptora na ćelijama mrkog masnog tkiva pacova, dokazano je da TSH podiže nivo mRNA za DIO2, kao i aktivnost DIO2 i sintezu UPC1 proteina in vivo i in vitro (Murakami i sar., 2001). Povećanje aktivnosti DIO2 kao rezultat adrenergične stimulacije i reaktivacije DIO2 deubikvitacijom se smatra značajnim faktorom povećanja ekstratireoidne konverzije T_4 u T_3 kod novorođenčadi (De Jesus i sar., 2001). Aktivnost DIO2 u mrkom masnom tkivu stimulišu i insulin i glukagon, dok je GH inhibira (Silva i Larsen, 1986). Tireoidni hormoni regulišu aktivnost DIO2 na pretranslacionom i posttranslacionom nivou, i to tako što T_4 povećava koncentraciju mRNA za DIO2, dok visoke koncentracije T_4 smanjuju njenu aktivnost. T_4 je takođe supstrat koji ubrzava proces posttranslacione obrade DIO2 t.j. ubikvitaciju molekula. Suprotno od T_4 , koncentracija T_3 unutar ćelije, smanjuje ekspresiju DIO2, ali povećava njenu aktivnost posebno u ćelijama mrkog masnog tkiva i mozga (St. Germain, 1988; Wagner i sar., 2007).

Dejodinaza tipa 3 je selenoenzim koji inaktivira tireoidne hormone, katališući dejodinaciju isključivo na unutrašnjem tirozil prstenu i tako vrši konverziju T_4 i T_3 u biološki neaktivne metabolite, rT_3 i T_2 . Primarni supstrat za DIO3, sa visokim afinitetom dejodinacije, je T_3 . Kapacitet dejodinacije unutrašnjog prstena je veći u odnosu na kapacitet dejodinacije DIO1 (Moreno i sar., 1994). DIO3 je membranski protein molekulske mase 32kDa, koji funkcioniše kao homodimer ili heterodimer, što je značajno za njegovu aktivnost (Sagar i sar., 2008). Molekul D3 je lociran na membrani ćelije, sa visoko konzerviranim transmembranskim domenom, i katalitičkim globularnim domenom lociranim ekstracelularno (Sagar i sar., 2008). Ipak, kataliza dejodinacije ovim enzimom se odvija intracelularno, na što ukazuje i koekspresija MCT8 transportera koji povećava aktivnost DIO3 (Friesema i sar., 2006). DIO3 nije osetljiva na dejstvo PTU, ali je osetljiva na delovanje iopanoične kiseline (Salvatore i sar., 1995).

S obzirom na biohemijske aktivnosti i tkivne distribucije DIO3, funkcija ovog enzima je da štiti tkiva od prekomerne koncentracije aktivnog oblika tireoidnih hormona t.j. modulira intracelularnu koncentraciju i aktivnost tireoidnih hormona, a time učestvuje u održavanju unutarćelijske tireoidne homeostaze. Održavanje homeostaze je omogućeno funkcionalnom interakcijom između DIO3 i DIO2. Tkivna ekspresija DIO3 je specifična po tome da postnatalno i kod adultne jedinke DIO3 ima nizak nivo

ekspresije i dominantno je prisutan na neuronima CNS, kože, gravidnog uterusa i mlečne žlezde (Gereben i sar., 2008; Connor i sar., 2005). Značajna ekspresija DIO3 je karakteristična za sinciotrofoblaste i citotrofoblaste humane placente i umbilikalne krvne sudove i ima za cilj ograničavanje izloženosti fetusa visokim koncentracijama tireoidnih hormona majke (Huang i sar., 2003). Prisustvo DIO3 u mnogim fetalnim tkivima (mozak, jetra, pluća, creva, koža, arterije i vene, epitel unutrašnjih organa) ukazuje da DIO3 ima značajnu ulogu u regulaciju homeostaze tireoidnih hormona tokom embrionalnog perioda (Huang i sar., 1986; Bates i sar., 1999). Istraživanja sprovedena na DIO3KO pacovima su pokazale da oni razvijaju brojne abnormalnosti, malformacije, poremećaj rasta, prenatalnu smrtnost i promene u koncentraciji TSH tokom prenatalnog i neonatalnog perioda, odnosno pokazuju poremećaje u razvoju tireoidne osovine kod novorođene životinje (Hernandez i sar., 2006).

Trijodtironin potencira ekspresiju DIO3 na transkripcionom nivou, i to tako što hipotireoidizam dovodi do opadanja, dok hipertireoidizam povećava njenu sintezu i aktivnost. Aktivnost DIO3 pored tireoidnih hormona stimuliše i retinoična kiselina na kulturama glijia ćelija (Esfandiari i sar., 1994). Pozitivni efekat na nivo DIO3 imaju estrogeni i progesteron, koji nezavisno pozitivno moduliraju ekspresiju DIO3 u uterusu (Bates i sar., 1999). Epidermalni faktor rasta (EGF), kiseli ili bazni fibroblastni faktor rasta i transformišući faktor rasta (TGF) stimulišu ekspresiju DIO3 (Hernandez i Obregon 1995). Povećanje ekspresije mRNK za DIO3 je takođe utvrđeno i tokom hipooksije kroz HIF (hipoxia inducible factor) mehanizam (Simonides i sar., 2008).

Ćelijska aktivnost tireoidnih hormona ostvaruje se na nekoliko nivoa, bilo da deluju na površini ćelije vezivanjem za membranske receptore i modulacijom propustljivosti ćelijske membrane ili nakon ulaska hormona u ćelije i aktivnosti izražene u ćelijskim strukturama ili jedru. Naime, danas se govori o genomskom i ne-genomskom mehanizmu aktivnosti tireoidnih hormona (Bassett, 2011). Genomski mehanizam zasniva se na vezivanju tireoidnih hormona za receptore koji se nalaze u jedru (TR) i regulaciju procesa genske transkripcije. Aktivnost tireoidnih hormona koja ne uključuje jedarne receptore već receptore plazma membrane i strukture ćelije, mitohondrije i citoskelet, označava se kao ne-genomski mehanizam. Genomska aktivnost tireoidnih hormona ispoljava se kao mehanizam značajan za rast, razvoj, diferencijaciju i održavanje homeostaze ćelije. Tireoidni hormoni, svoja genomsku

aktivnost ostvaruju vezivanjem za tireoidne jedarne receptore, koji pokazuju afinitet za sve tireoidne hormone. Afinitet je u korelaciji sa biološkom aktivnošću tako da se T_3 smatra primarnim supstratom nuklearnih receptora, jer TR imaju preko 10 puta veći afinitet vezivanja za T_3 u odnosu na T_4 (Muñoz i Bernal. 1997). Zasićenje jedarnih receptora je tkivno specifično, i to tako da mozak, hipofiza, mrko masno tkivo i sva druga tkiva u kojima je glavni izvor T_3 unutarćelijska konverzija dejodinazom tipa 2, imaju najveće zasićenje jedarnih receptora sa više od 75% (Koenig, 2003).

Receptori za tireoidne hormone pripadaju porodici nuklearnih receptora, transkripcionim faktorima, koji uključuju i receptore za steroidne hormone, vitamin D3 i retinoide (Huang i sar 2010). Kao i ostali nuklearni receptori, i molekul tireoidnih receptora sastoji se od jediničnog polipeptidnog lanca na kome se razlikuju 3 glavna funkcionalna domena: varijabilni N terminalni A/B domen (ligand-nezavisan funkcionalni aktivacioni domen AF-1), centralni DNA vezujući domen (DNA binding domain-DBD) koji sadrži dva zavoja sa cinkom („zink fingers“), C terminalni ligand vezujući domen (LBD – ligand binding domen) koji sadrži funkcionalni ligand-zavisan aktivacioni domen AF2 i zglobni region koji se nalazi između DBD i LBD (Yen i sar., 2001). Dva različita gena, THRA (NR1A1) i THRB (NR1A2) kodiraju TR α i TR β izoforme receptora (Williams, 2000). THRA kodira TR α 1, TR α 2 i TR α 3 izoforme dok THRB gen kodira TR β 1, TR β 2 i TR β 3. Sve izoforme tireoidnih receptora imaju male strukturne varijacije u DBD i LBD domenu, a glavne varijacije nalaze se na N terminalnom A/B domenu. Aktivni izomeri tireoidnih receptora su TR α 1, TR β 1, TR β 2 i TR β 3 (Lazar, 2003; Cheng i sar., 2010). Ekspresija pojedinih izoformi TR ima specifične preferencije za određena tkiva što ukazuje na različite funkcije u različitim tkivima (Cheng, 2000).

Tireoidni receptori moduliraju transkripciju vezivanjem DBD domena za specifične receptorske sekvence na DNK ili TRE (thyroid hormone response elements) (Umesono i Evans, 1989). Nakon prepoznavanja specifične receptorske sekvence DNK, TR se vezuje u obliku homodimera (TR-TR) ili heterodimera sa RXR (retinoid X receptor). Heterodimerizacija sa RXR drastično povećava afinitet vezivanja TR za TRE, odgovor na stvoreni kompleks T_3 i TR i aktivaciju transkripcije (Zhang i Kahl, 1993). Tireoidni receptor se nalazi u konformacijskom obliku aporeceptora, kada je LBD slobodan, odnosno kada za njega nije vezan T_3 , ili u holoreceptorskom konformacionom

obliku, kada je za LBD domen na TR vezan T_3 (Chassande, 2003). Konformacioni oblik apoTR homodimera ili heterodimera je takođe aktivan oblik TR, on ulazi u jedro ćelije i vezuje se za TRE, ali tako vrši represiju bazalne transkripcije (Zhang i sar., 1991). Proces inhibicije je omogućen i vezivanjem posredničkog molekula, koji ima represorni efekat, ili korepresora, koji direktnim ili indirektnim putem inhibiraju deacetilaciju histona. U korepresorske molekule koji se vezuju za TR spadaju NCoR (nuclear corepressor) i SMRT (silencing mediator for RXR and TR) (Astapova i Hollenberg, 2013). Korepresorski molekuli formiraju kompleks sa heterodimerom TR, koji uključuje i dodatne molekule sa enzimskom funkcijom: HDAC3 (histone deacetylase 3), DNA-PK (DNA-dependent proteinkinase) i PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1) (Jeyakumar i sar., 2007). Represivni efekat TR je rezultat direktnog vezivanja, zajedno sa korepresorskim kompleksom, za transkripcioni faktor IIB (TFIIB), ključnu komponentu bazalne transkripcije.

Vezivanjem liganda T_3 za TR homodimer, nastaju konformacione promene TR ili TR holoreceptor, pri čemu dolazi do disocijacije homodimera i oslobađanje korepresora. Kod heterodimera, receptor ostaje vezan za DNK, ali nastaje zamena korepresornog sa koaktivatorskim posredničkim molekulom. U oba slučaja, kod holoreceptora, uz vezivanjem koaktivatorne posredničke molekule, nastaje aktivacija procesa transkripcije. U koaktivatorske molekule na TR ubrajaju se: steroidni receptorski koaktivator (SRC-1steroid receptor coactivator), koji pored uticaja na steroidne hormone, ima uticaj i na tireoidne hormone aktivacijom transkripcije, CREB vezujući protein (CBP-cAMP response element binding protein-binding protein) i koaktivatorski kompleks TRAP (TR-associated proteins) (Shao i sar., 2000). Proces fosforilacije TR, RXR i koaktivatorski posrednički molekuli povećavaju transkripcionu aktivnost T_3 na target genima. Fosforilacija TR posredovana ligandom uključuje i proces disocijacije korepresora i fosforilaciju koaktivatora putem aktivacije MAP kinaza sistemom (Davis i sar., 2000). Smatra se da je ligand-nezavisna aktivnost TR rezultat fosforilacije receptora specifične ćelijske kinaze, fosfataze ili membranskog signalnog receptora.

Negenomski mehanizam aktivnosti tireoidnih hormona je nezavisan od jedarnih TR. To je brz odgovor koji uključuje membranske i citosolne receptore i signalne mehanizme, mitohondrijalne efekte i efekte na citoskelet ćelije (Davis i Davis, 1996).

Negenomska aktivnost indirektno utiče i na genomski odgovor, odnosno inicijaciju odgovora determinisanu genomskom ili negenomskom aktivnošću, što je dokaz da postoji ćelijska genomska i negenomska unakrsna aktivnost tireoidnih hormona (Cheng i sar., 2010). Integrin $\alpha\beta3$ je integralni membranski receptor koji sadrži domen koji vezuje T_3 i T_4 i aktivira biohemijske mehanizme unutar ćelije (Davis i sar., 2011). Vezivanjem hormona za receptor aktivira se MAPK/ERK1/2 mehanizam koji reguliše intraćelijski proteinski transport i translokaciju u jedro, fosforilaciju serinskih ostataka na cink-zavojnim molekulima TR β 1 i aktivaciju Na^+/H^2 kotransportera (Davis i sar., 2000; Cheng i sar., 2010). Tireoidnim hormonima aktivirani mitogeni mehanizmom MAP kinaza, takođe iniciraju fosforilaciju STAT1 α (signal transducer and activator of transcription) INF γ aktivirane molekule i stimulišu njihovu translokaciju u jedro i vezivanje za GAS (IFN- γ -activated sequences) sekvence na DNK. Vezivanje tireoidnih hormona za citosolni TR β 1 aktivira fosfatidil inozitol 3 kinazu (PI3K), koja posreduje u transportu TR α u jedro i transkripciji specifičnih gena, kao što je HIF1 α , GLUT1, anti-kalcineurin gen (ZAKI-4) značajan tokom razvoja nervnog tkiva i reguliše membransku ekspresiju i aktivnost Na^+/K^+ ATP transportera (Davis i sar., 2008). Ranija istraživanja ukazuju da T_3 negenomskim putem, kao i direktnim efektom na membranski transportni sistem, povećava preuzimanje glukoze u ćelije (Segal, 1989). Tireoidni hormoni reguliše koncentraciju jona kalcijuma unutar ćelije, što je karakteristično za muskulaturu, mišiće srca i eritrocite, kroz modulaciju aktivnosti transportera jona Na^+ i promene polariteta ćelije, što rezultira aktivacijom Na^+/Ca^{2+} transportera i promenom koncentracije jona Ca^{2+} ili kroz regulaciju aktivnosti membranske Ca^{2+} -ATP pumpe i prisustvo kalmodulina. Mehanizam tireoidne regulacije aktivnosti Ca^{2+} -ATP pumpe se smatra protein kinaza (PCK) zavisnim mehanizmom (Davis i Davis, 1996; Cheng i sar., 2010).

Negenomskim mehanizmima, tireoidni hormoni reguliše ekspresiju i aktivnost DIO2. Naime, smatra se da T_4 inhibira aktivnost DIO2, stimuliše endozomalnu degradaciju i recikliranje molekula enzima ili r T_3 indukovanu proteazomsku degradaciju molekula DIO2 (Farwell i sar., 1996; Steinsapir i sar., 2000). Aktivnost dejodinaze tipa 2 je takođe regulisana i negenomskom aktivnošću tireoidnih hormona. Tiroksin stimuliše polimerizaciju aktina kod cAMP stimulisanih ćelija, što je značajno za inhibiciju aktivnosti DIO2 (Farwell i sar., 1996). Polimerizaciju aktina stimulišu

jedino T_4 i rT_3 , tako da nedostatak tiroksina dovodi do nedostatka filamenata aktina i povećanja solubilnog oblika aktina u astrocitima. Zbog toga se ovo stanje davanjem T_3 ne menja (Siegrist-Kaiser i sar., 1990). Karakterističan negenomski efekat tireoidnih hormona je i efekat na mitohondrijalnu aktivnost u smislu stimulacije sinteze ATP i ekspresije i aktivnosti UCP1 u mrkom masnom tkivu što je značajno za proces termogeneze (Cheng i sar., 2010).

2.5. Specifičnosti tireoidne osovine teladi tokom neonatalnog perioda života

Neonatalnim periodom kod novorođene teladi smatra se period od rođenja pa do 28 dana starosti, kao tranzicioni period u kome nastaju metaboličke i endokrine promene koje imaju za cilj efikasnu adaptaciju na novu sredinu i značajne su za dalji rast i razvoj novorođene životinje. Rani neonatalni period koji obuhvata prvih 24 sata nakon rođenja, karakteriše se dramatičnim endokrinim i metaboličkim promenama koje su kritične za opstanak teladi (Kirovski, 2015).

Aktivnost tireoidne osovine tokom neonatalnog perioda je od ključnog značaja za adaptaciju novorođene životinje na ekstrauterinu sredinu, uzimajući u obzir da je mehanizam adaptacije veoma zavisano od stepena njenog prenatalnog sazrevanja (Forhead i Fowden, 2014). Ispitivanja stepena sazrevanja tireoidne osovine kod pacova ukazuju na to da se novorođeni pacovi rađaju se sa nepotpuno razvijenom tireoidnom osovinom (Oppenheimer i sar., 1997). Suprotno tome, novorođena jagnjad se rađaju sa gotovo potpuno razvijenom tireoidnom osovinom (Fisher, 1991). Ranija istraživanja razvoja tireoidne osovine kod teladi tokom fetalnog perioda ukazuju da štitasta žlezda pokazuje aktivnost već tokom ranog gestacionog perioda. Knoeff i saradnici (1949) utvrdili su da prvo fetalno prihvatanje joda u štitastu žlezdu nastaje oko 60. dana gestacije, dok su Kossila i saradnici (1967) 84. dana gestacije utvrdili subfolikularnu diferencijaciju štitaste žlezde sa veoma malo koloida u folikularnom lumenu koji se nakon tog perioda počeo uvećavati. Hernandez i saradnici (1972) su merili koncentracije T_4 još 90. dana fetalnog razvoja i dobili vrednosti od oko $2,2\mu\text{g}/100\text{ml}$, dok je vrednost oko 180. dana gestacije bila oko pet puta viša ($11,7\mu\text{g}/100\text{ml}$). Isti autori su utvrdili da tokom fetalnog perioda, pored povećanja koncentracije T_4 , dolazi i do porasta koncentracije proteina koji vezuju jod, što ukazuje da se tokom fetalnog razvoja povećava prihvatanje joda u štitastoj žlezdi. Najveći nivo prihvatanja utvrđen je na

samom kraju graviditeta, tako da su koncentracije joda u periodu rađanja kod teladi značajno veće (32,8µg/dl) u odnosu na njihove majke (4µg/dl) (Hernandez i sar., 1972). Slične podatke navode i Cassar-Malek i saradnici (2007). Povećanje stepena preuzimanja joda u fetalnoj tireoidi je u korelaciji sa povećanom sintezom T₄, koja se odigrava u zadnjoj trećini graviditeta i ima za posledicu značajno više koncentracije T₄ u krvi teladi u odnosu na njihove majke (Strbak i Tomsik, 1988). Suprotno od koncentracije T₄, koncentracija T₃ je tokom fetalnog perioda niska, i ima tendenciju postepenog povećanja do kraja graviditeta, što je najverovatnije rezultat povećanja periferne dejodinacije T₄ u T₃ (Strbak i Tomsik, 1988; Cassar-Malek i sar., 2007). Niske koncentracije T₃ u krvi prenatalne teladi održavaju se povećanom sulfatacijom T₃ i povećanom aktivnošću DIO₃, uz istovremeno povećanje koncentracije rT₃, što potencira sazrevanje tireoidne osovine (Wu i sar., 2006; Hernandez i sar., 2006). Hernandez i saradnici (1972) su u svom istraživanju ispitivali koncentracije TBG i afinitet vezivanja hormona u serumu teladi tokom prenatalnog perioda, i utvrdili da se tokom ovog perioda koncentracija TBG i kapacitet vezivanja povećavaju, da bi tokom prvih dana postnatalno kapacitet vezivanja TBG opao. Više koncentracije TSH tokom fetalnog perioda u odnosu na one ustanovljene kod odraslih jedinki rezultat su povećane koncentracije TBG i većeg kapaciteta vezivanja T₄, kao i povećane rezistentnosti hipotalamusa i hipofize na T₄ tokom fetalnog perioda, što dovodi do povećanja sekrecije TRH (Radunović i sar., 1991; Fisher i sar., 2000).

Tokom ranog neonatalnog perioda života aktivnost tireoidne osovine kod novorođene životinje je veoma intenzivna, pre svega zbog potrebe za adaptacijom na niže temperature u ekstrauterinoj sredini. Radovi mnogih autora ukazuju da se telad rađaju sa relativno visokim perifernim koncentracijama tireoidnih hormona (Davicco i sar., 1982; Stoić i sar., 2002; Kirovski i sar., 2011). Koncentracije tireoidnih hormona se tokom prvih nekoliko sati nakon rađanja povećavaju, i statistički su značajno veće u odnosu na odrasle jedinke. Maksimalne koncentracije utvrđene su tokom prvog dana života, da bi potom imale tendenciju postepenog opadanja (Davicco i sar., 1982; Takahashi i sar., 2001). Značajniji pad koncentracije tireoidnih hormona u krvi teladi ustanovljen je sedmog dana starosti, kada su njihove koncentracije značajno niže u odnosu na prvi dan (Jovanović i sar., 1982; Stoić i sar., 2002). Povećanje koncentracija tireoidnih hormona predstavlja prirodni zaštitni mehanizam za očuvanje života teladi

nakon suočavanja sa novom sredinom. Naime, adaptacioni mehanizmi omogućavaju zadovoljavanje povećanih potreba za energijom i toplotom, neophodnih za aktivnost teleta i održavanje homeostaze metabolizma i telesne temperature (Vermorel i sar., 1983; Jain i sar., 2006). Stojić i saradnici (2005) povezuju povećanje koncentracije tireoidnih hormona u prvim satima i danima neonatalnog života i sa mogućnošću prenatalnog stvaranja rezervi tireoidnih hormona, koji su lako dostupni tokom kritičnog perioda nakon rađanja. Smanjeni kapacitet vezivanja i povećanje indeksa saturacije TBG na kraju graviditeta i tokom perioda rađanja, omogućava povećanje nivoa slobodnog T_4 , kako bi on bio metabolički dostupan u periodu ranog neonatalnog života (Godfrey i sar., 1991; Jain i sar., 2006). Kirovski i saradnici (2011) su utvrdili da je vrednost koncentracije T_3 značajno rasla tokom prva dva sata neonatalnog života teladi, što nije bilo slučaj sa koncentracijama T_4 koje su opadale tokom prvih 90 minuta. Isti autori navode da se u tom periodu odnos T_3/T_4 povećava kao rezultat povećane aktivnosti periferne 5' dejodinaze, sve do prvog napoja kolostralnog mleka, nakon čega je utvrđeno povećanje koncentracije oba tireoidna hormona. Povećanje periferne koncentracije tireoidnih hormona tokom neonatalnog perioda je rezultat visoke koncentracije TSH u prvim satima nakon rađanja, ali značajan faktor koji je reguliše je i aktivnost periferne 5' dejodinaze, odnosno stepen konverzije T_4 u T_3 u perifernim tkivima (Bianco i sar., 2002). Periferna konverzija je takođe i rezultat genske adrenergične stimulacije i aktivnosti DIO2, koja se dominantno odvija u mrkom masnom tkivu i potpomaže termoregulaciju u prvim danima neonatalnog života (De Jesus i sar., 2001).

Istraživanja kretanja koncentracije TSH kod novorođene dece ukazuju da se ona rađaju visokim koncentracijama TSH u perifernoj cirkulaciji i da se maksimalna koncentracija TSH dostiže u prvim satima nakon rađanja. Smatra se da je neonatalni porast koncentracije TSH rezultat naglog pada temperature okoline nakon rađanja (Fisher i Odell, 1969; Feingold i Brown 2010). Visoku koncentraciju TSH u prvim satima neonatalnog života jagnjadi registrovali su Wrutniak i saradnici (1987) koji su ga takođe povezali sa naglim padom temperature sredine i odgovorom tireoidne osovine na nagle promene. Guyot i saradnici (2007a) smatraju da se i kod teladi dešavaju slična kretanja koncentracija TSH u neonatalnom periodu, što su potvrdili i rezultati njihovog istraživanja, koje je pokazalo da je koncentracija TSH kod teladi tokom prvog dana

neonatalnog života bila značajno viša u odnosu na vrednosti ustanovljene kod njihovih majki. Značajnije povećanje koncentracije tireoidnih hormona kod teladi starih 21 dan nakon aplikacije fizioloških doza TSH u odnosu na davanje istih doza TSH tokom prvih 12 sati od rođenja utvrdili su Davicco i saradnici (1982), koji to objašnjavaju saturacijom TSH receptora u prvih nekoliko sati nakon rođenja, kao i smanjene senzitivnosti tiroidee na stimulaciju sa TSH. Kod starije teladi pad koncentracije tireoidnih hormona u cirkulaciji dovodi do povećane ekspresije TSH receptora i povećane osetljivosti na tretman sa TSH (Davicco i sar., 1982).

Stojić i saradnici (2002) i Kirovski i saradnici (2012) ukazuju na značajna odstupanja u literaturnim podacima vezanim za koncentraciju tireoidnih hormona u krvi teladi tokom neonatalnog perioda, što tumače jakim uticajem niza faktora koji mogu da menjaju aktivnost tiroidne osovine. Uticaj godišnjeg doba rađanja teladi na koncentraciju tireoidnih hormona opisuju Stanko i saradnici (1991) dok Davicco i saradnici (1982) opisuju razlike koje postoje između pojedinih rasa. Grongnet i saradnici (1985) povezuju nivo koncentracija tireoidnih hormona i uzimanja kolostruma, ukazujući da je pravovremeno uzimanje kolostruma i unos imunoglobulina tokom neonatalnog perioda od velikog značaja za funkciju tiroidne osovine. Povećanje koncentracije tireoidnih hormona tokom prvih sati nakon rođenja Stojić i saradnici (2002) takođe povezuju sa količinom unetog kolostruma tokom prvih 2 sata nakon rađanja. Steinhardt i saradnici (1995) smatraju da nivo koncentracije tireoidnih hormona pokazuje individualnu specifičnost i nalaze korelaciju između nivoa tireoidnih hormona majke i teladi. Vermorel i saradnici (1983) su utvrdili da telad rođena pri otežanom porođaju imaju niže vrednosti tireoidnih hormona u poređenju sa teladi rođenom pri normalnom porođaju.

2.6. Uticaj aktivnosti tiroidne osovine na endokrini i metabolički status teladi

2.6.1. Uticaj aktivnosti tiroidne osovine na IGF system

Rast i razvoj tokom neonatalnog perioda je primarno regulisan funkcionalnom interakcijom tiroidne osovine i komponenti somatotropne osovine. Somatotropna osovina je sistem formiran od hormona rasta (GH), faktora rasta sličnih insulinu I i II (IGF-I i IGF-II), njihovih proteinskih nosača (IGFBP 1-6), receptora i IGFBP proteaza

(Renaville i sar., 2002; Lelbach i sar., 2005). IGF-I i IGF-II su ključne komponente somatotropne osovine. To su relativno konzervativni jednolančani polipeptidi, molekulske mase oko 7,5 kD, koji pokazuju visoku međusobnu strukturnu homologiju i strukturnu homologiju sa proinsulinom. Homologija u aminokiselinskom sastavu između IGF molekula i proinsulina je karakteristična za A i B domene i iznosi oko 50%, a nije karakteristična za C domen koji kod molekula IGF ostaje vezan za aktivni oblik molekula. IGF molekuli sadrže i dodatni D domen na C terminalnom delu molekula, koji takođe nije karakterističan za molekul proinsulina (Brzozowski i sar., 2002). Sinteza i sekrecije IGF molekula se razlikuje od sinteze i sekrecije ostalih peptidnih hormona. Iako im je jetra dominantni organ sinteze i sekrecije, molekuli IGF se sintetisu i u mnogim drugim tkivima. GH je primarni regulator sinteze i sekrecije IGF-I, dok je sinteza IGF-II relativno nezavisna od hormona rasta (Woelfle i sar., 2003; Pavelić i sar., 2007). Sintezu i sekreciju IGF-I poreklom iz jetre reguliše GH mehanizmom negativne povratne sprege (Ohlsson i sar., 2009).

Primarna biološka uloga IGF-I i II je endokrino posredovanje u metaboličkim, posebno anaboličkim, efektima GH, kao i parakrina i autokrina regulacija ćelijskog rasta, diferencijacije i apoptoze (Lelbach i sar., 2005). IGF-I i II molekuli svoje efekte ostvaruju vezivanjem za dva tipa specifičnih membranskih receptora, IGF-IR i IGF-IIR. Strukturna homologija molekula IGF-I i II sa molekulom insulina objašnjava i mogućnost vezivanja insulina za IGF receptore (Varewijck i Janssen, 2012). IGF-IR je tirozin kinazni receptor koji ima izrazitu strukturnu sličnost sa receptorom za insulin, poseduje ubikvitarnu ekspresiju, i karakterističan je po tome da jakim afinitetom veže oba IGF liganda, dok insulin veže 100 puta slabijem afinitetom (Blakesley i sar., 1996). IGF-IIR se strukturno razlikuje od IGF-IR i ne pokazuje homologiju sa receptorom insulina. Po strukturi on je identičan sa katjonski nezavisnim receptorom za manozu-6-fosfat, za koga se vezuje i manozu-6-fosfat peptid. IGF-IIR jakim afinitetom veže jedino molekule IGF-II (El-Shewy i Luttrell, 2009). Mitogena i metabolička aktivnost IGF-I i II se primarno ostvaruje vezivanjem za IGF-IR.

U serumu i ostalim telesnim tečnostima, molekuli IGF-I i II su pretežno vezani za IGF vezujuće proteine, koji im produžavaju polужivot, transportuju ih do ciljne ćelije i moduliraju im interakciju sa membranskim IGF receptorima (Jones i Cllemons, 1995; KostECKa i Blahovec, 1999). Vezivanjem IGF I i II za IGFBP visokim afinitetom,

reguliše se distribucija i koncentracija molekula IGF u specifičnim tkivima i povećava ili inhibira njihova funkcija. To su proteini sa različitom molekulskom masom, koji dele određeni stepen strukturne homologije, dok je njihova varijabilna sekvenca ključna za specifične osobine svakog člana ove familije, utičući na afinitet vezivanja IGF molekula i njihovu aktivnost i funkciju. IGFBP takođe pokazuju i IGF-nezavisne funkcije, kao što su inhibicija i stimulacija rasta specifičnih ćelije i tkiva, direktna indukcija apoptoze i modulacija aktivnosti ostalih faktora rasta (Mohan i Baylink, 2002; Duan i Xu, 2005).

Ključnu ulogu u rastu i diferencijaciji ćelija, tkiva i organa IGF sistem ostvaruje još od najrane faze embrionalnog razvoja. Povećanu ekspresiju IGF-I mRNA u endometriju krave tokom rane gestacije utvrdili su Robinson i saradnici (2000). Isti autori su ukazali na povećanu ekspresiju IGF-II mRNA u regionu karunkula što ukazuje na ulogu IGF-II u pripremanju karunkula za graviditet, odnosno formiranje placentе. Prisustvo mRNA za IGF-I i mRNA za IGF-II, kao i receptora za IGF-I i njihova parakrina i autokrina uloga su takođe potvrđene u placentarnom tkivu (Sibley i sar., 2004). Ekspresiju IGF-I, IGF-II i ostalih faktora rasta u ćelijama ovčijeg embriona, tokom preimplantacione embrionalne faze, opisali su Watson i saradnici (1994). Istraživanja kod pacova ukazuju da IGF-I i insulin, koji se proizvode u embrionalnom tkivu tokom prepankreasnog stadijuma embrionalnog razvoja, stimulišu rast embrionalnih ćelija (Spaventi i sar., 1990). Uloga IGF sistema tokom intrauterinog rasta i razvoj embriona, ispitana je na transgenim pacovima sa mutacijama na genima koji kodiraju ekspresije IGF-I, IGF-II ili njihovih receptora. Ova istraživanja pokazala su da mutacije na genima za IGF-I i IGF-II dovode do retardacije intrauterinog rasta u oko 90% slučajeva, dok mutacije gena za IGF receptore nisu dovele do poremećaja rasta, što je verovatno rezultat sposobnosti molekula IGF da deluju preko insulinskih receptora, kao alternativnih (DeLeon i sar., 2004). Fowden (1995) navodi da oba IGF povećavaju fetalnu sintezu proteina i glikogena, pri čemu IGF-I reguliše ćelijsku proliferaciju uticajem na endokrine i nutritivne faktore, dok je IGF-II utiče na feto-placentarni razvoj i specifičnu tkivnu diferencijaciju. Tokom fetalnog perioda, IGF molekuli se sintetišu u mnogim tkivima fetusa (D'Ercole i sar., 1980). Placentarni transport IGF molekula je ograničen, tako da je fetus zavisn od sopstvene proizvodnje IGF molekula (Lawrence i sar., 2012). Koncentracija IGF-II u serumu fetusa je nekoliko puta veća u odnosu na koncentracije IGF-I (Lawrence i sar., 2012). Fetalne koncentracije IGF regulisane su

primarno koncentracijom glukoze i insulina. Oliver i saradnici (1996) navode da postoji nezavisna regulacija fetalne koncentracije IGF-I i IGF-II, i to tako da je glukoza značajan faktor regulacije oba IGF molekula, ali je IGF-I regulacija posredovana insulinom, dok je regulacija IGF-II insulin-nezavisna. Ishrana majke, a time i fetusa, je značajan faktor koji reguliše proizvodnju fetalnog IGF. Uticaj nutritivnih faktora na koncentraciju IGF-I u cirkulaciji fetusa, objašnjava se u radovima u kojima se ispituje endokrini status fetusa poreklom od majki koje su gladovale. Ovi radovi ukazuju da nutritivni deficit i nedostatak glukoze dovode do zastoja u rastu tokom svih faza gestacije, i da je taj zastoj praćen smanjenjem koncentracije IGF-I u fetusu i promenama u koncentraciji IGF vezujućih proteina (Gallaher i sar., 1995; Heasman i sar., 1999; Osgerby i sar., 2002).

Sinteza i koncentracija proteina koje vezuju IGF se razlikuju tokom prenatalnog i postnatalnog perioda. Tokom fetalnog razvoja, dominiraju IGFBP-1 i IGFBP-2 (Clemmons i sar., 1993). Zbog manjeg afiniteta fetalnog IGFBP-1 prema IGF molekulima i povećanja koncentracije dvokomponentnog kompleksa IGFBP-2-IGF-I omogućava se veća dostupnost IGF molekula do ciljnog tkiva. Visoke koncentracije, odnosno visoka relativna zastupljenost IGFBP-2 utvrđene su kod fetusa svinje, posebno tokom prve polovine gestacije (Lee i sar., 1993). Istraživanja sprovedena na fetusima ovaca ukazuju da je i kod njih IGFBP-2 dominantan fetalni proteinski nosač za IGF molekule (Gallaher i sar., 1995). Carr i saradnici (1995) su utvrdili slične fetalne koncentracije IGFBP-2 u serumu fetusa ovce, koje su bile u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama IGF-II i ukazivale su na tkivnu specifičnost sinteze IGFBP-2 molekula tokom gestacionog perioda.

Prenatalni i neonatalni period je karakterističan po tome da nastaju promene aktivnosti i funkcionisanja somatotropne osovine. Nakon rođenja IGF-I postaje dominantni parakrini faktor rasta (Butler i LeRoith, 2001). Ekspresija mRNA za IGF-I i sinteza IGF-I kod novorođene životinje se odigrava u jetri, digestivnom traktu, slezeni, timusu, limfnim čvorovima i bubrezima (Cordano i sar., 1998). Hammon i Blum (1997) ukazuju na funkcionalnost somatotropne osovine kod teladi u neonatalnom periodu, dok su Corando i saradnici (2000) i Pfaffl i saradnici (2002) utvrdili nisku ekspresiju mRNA IGF-I u jetri neonatalne teladi i slab uticaj GH na IGF sistem tokom neonatalnog perioda, a što su povezali sa niskim stepenom maturacije somatotropne osovine.

Aplikacija analoga IGF-I molekula (Long-R3-IGF-I) dovodi do pada koncentracije GH, što je dokaz da kod teladi tokom neonatalnog perioda mehanizam negativne sprege IGF-I i GH funkcioniše. Govoni i saradnici (2004) su utvrdili da davanje bovinog GH u prva 24 časa nakon rođenja dovodi do povećanja serumske koncentracije GH i povećanja koncentracije IGF-I tokom prva 3 dana nakon rođenja.

Istaživanja koncentracije IGF-I kod neonatalne teladi pokazala su da je energetski status novorođene životinje primarni faktor koj reguliše koncentraciju IGF-I. Nutritivni faktori, odnosno uzimanje kolostruma u prvim satima nakon rađanja ima značajan efekat na metabolički, hormonalni i imunološki status novorođene životinje (Blum i Hammon, 2000; Blum, 2006). Utvrđeno je da količina i vreme uzimanja kolostruma utiču na ekspresiju mRNA za IGF-I i sintezu IGF-I u jetri neonatalne teladi. Kolostrum sadrži relativno visoke koncentracije IGF-I koje se nalaze u aktivnom obliku (Skaar i sar., 1991; Kang i sar., 2007). Koncentracije IGF-I u kolostrumu uglavnom ne utiču na koncentraciju IGF-I u krvnoj plazmi novorođene teladi, uzimajući u obzir veoma mali stepen resorpcije molekula IGF-I. Primarni značaj kolostralnog IGF-I je lokalni pozitivni uticaj na rast i razvoj digestivnog trakta, kao i stimulatívni efekat na varenje i resorpciju. Smanjeni uticaj kolostralnog IGF-I na koncentraciju IGF-I u plazmi novorođene teladi Rauprich i saradnici (2000) povezuju sa time da se maksimalne koncentracije IGF-I u kolostumu nalaze na početku laktacije i ne utiču na povećanje koncentracije IGF-I u plazmi teladi nakon prvog unosa kolostruma. Baumrucker i Blum (1994) navode da je resorpcija u gastrointestinalnom traktu novorođene životinje zavisna od oblika u kome se nalazi IGF-I. Isti autori zaključuju da jedino slobodni oblik IGF-I može lako da se resorbuje, dok proteini koji vezuju molekule IGF-I otežavaju resorpciju ovog molekula. Maksimalne koncentracije IGF-I u plazmi novorođene teladi nakon drugog obroka kolostruma registrovali su Lee i saradnici (1995). Isti autori su merenjem koncentracije IGF-I i II u krvi teladi pre i posle uzimanja kolostruma utvrdili neznatan nivo resorpcije IGF molekula. Promenu koncentracije IGF-I nakon rođenja kod neonatalne teladi, u svojim radovima objašnjavaju Kirovski i saradnici (2002). Naime, analizom vrednosti koncentracije IGF-I kod teladi koja su bila napajana različitom količinom kolostruma tokom prvih 32 sata postnatalnog života, Kirovski i saradnici su utvrdili da količina kolostruma u ovom periodu ima značajan uticaj na koncentracije IGF-I u krvi teladi. Isti autori smatraju da povećane vrednosti

koncentracija IGF-I kod teladi koja su bila napajana optimalnom količinom kolostruma (1,5 litara u prva dva i 2 litra u trećem napajanju), kao i veći unos proteina, dovode do poboljšanja energetskeg statusa jedinke i imaju stimulatívni efekat na endogenu sintezu IGF-I u tkivima novorođene teladi. Pozitívni efekat unosa velike količine proteina na koncentraciju IGF-I u serumu neonatalne teladi i povećanje njihove telesne mase utvrdili su Smit i saradnici (2002). Pozitívnu korelaciju između energetskeg statusa, telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IGF-I u krvi utvrdili su Kirovski i saradnici (2009). Energetski status i metabolizam teladi tokom prva 2 sata nakon rođenja, pre prvog unosa kolostruma, zavisi značajno od serumske koncentracije IGF-I. Opadajuće vrednosti koncentracije IGF-I u serumu novorođene teladi pre prvog napajanja kolostrumom, Kirovski i saradnici (2011) objašnjavaju negativnim energetskim statusom jedinke koji je rezultat gladovanja i niske koncentracije glukoze i insulina u cirkulaciji. Isti autori ukazuju na pozitívnu korelaciju između koncentracija insulina i IGF-I tokom prvih sati postnatalnog života, a time i na značaj pravovremenog i optimalnog unosa kolostruma nakon rođenja za održavanje optimalnog energetskeg statusa novorođene životinje (Kirovski i sar., 2008).

Postnatalna promena koncentracije IGF-I je u pozitívnoj korelaciji sa promenom koncentracije IGFBP-3. IGFBP-3 je dominantni vezujući protein za IGF-I molekule u serumu odrasle jedinke. On vezuje molekule IGF-I visokim afinitetom u obliku koga čine tercijalni kompleks koji sadrži ALS (84-86 kDa) (Kostecka i Blahovec, 2002). Tercijarni kompleks velike molekulske mase od 150kDa omogućava stabilnost molekula IGF-I i reguliše dostupnost IGF-I do ciljnih tkiva. Kod novorođene teladi u prvim satima nakon rođenja karakterističan je pad koncentracije IGFBP-3 (Kirovski i sar., 2011). Niske koncentracije ovog vezujućeg proteina se održavaju do početka kolostralnog napoja. Hammon i saradnici (2000) su utvrdili povećanje koncentracije IGF-I i IGFBP-3 u serumu teladi koja su bila napajana kolostrumom u prvim satima nakon rođenja, dok su u serumu teladi napajanih tek 12 ili 24 sata nakon rođenja utvrdili niske koncentracije IGF-I i IGFBP-3, kao i sniženje odnosa IGFBP-3/IGFBP-2. Pored pozitívno uticaja nutritivnih faktora, na porast koncentracije IGFBP-3 utiče i starost životinje (Skaar i sar., 1994). Govoni i saradnici (2004) su utvrdili da, pored povećanja koncentracije IGF-I u serumu novorođene teladi, tretman sa bovinim GH u prva 24 časa nakon rođenja dovodi i do povećanja koncentracije IGFBP-3. Negativna korelacija IGF-

I sa IGFBP-2 je karakteristična za postnatalni period. Rausch i saradnici (2002) navode da se opadanjem koncentracije IGFBP-2 u postnatalnom periodu, pravovremenim unosom optimalne količine kolostruma ili davanjem GH, povećava biološka aktivnost IGF-I. Ovi navodi se mogu povezati sa utvrđenom negativnom korelacijom između insulina i IGFBP 2 kod krava u laktaciji koju su opisali McGuire i saradnici (1995). Negativna korelacija u odnosu na insulin je takođe karakteristična za IGFBP 1. Koncentracije IGFBP 1 u postnatalnom periodu opadaju nakon unosa kolostruma. Izostanak efekta insulina na IGFBP-1 kod novorođene teladi, Kirovski i saradnici (2008) povezuju sa refraktarnošću neonatalne jetre na uticaj insulina, uzimajući u obzir da većina molekula IGFBP-1 u cirkulaciji, potiče iz jetre.

Tireoidni hormoni utiču na rast i diferencijaciju ćelija uticajem na intenzitet njihove metaboličke aktivnosti, ali i modulacijom sinteze IGF (Fowden i Forhead, 2004). Istraživanja pokazuju da su tireoidni hormoni posebno značajni za funkciju somatotropne osovine tokom kasne faze graviditeta i neonatalnog perioda. Mesiano i saradnici (1989) su tokom završne faze graviditeta utvrdili niske fetalne koncentracije IGF-I kod hipofizektomisanih ovčijih fetusa u poređenju sa kontrolnom grupom, što nije bilo slučaj sa IGF-II. Ovi autori su ustanovili da je davanje egzogenog T₄ dovelo do povećanja koncentracije IGF-I, što je ustanovljeno i kod hipofizektomisanih fetusa svinja (Latimer i sar., 1993). U ovom radu su autori dokazali i porast koncentracija IGFBP-1, IGFBP-2 i IGFBP-4 nakon davanja T₄. Supresija ekspresije GHR i niske ekspresije mRNA za IGF-I u kasnom graviditetu utvrđene su u skeletnoj muskulaturi tireoidektomisanih fetusa ovaca (Forhead i sar., 2002).

Aktivnost i regulacija IGF sistema tokom fetalnog perioda je relativno nezavisna od koncentracije hormona rasta. Naime, efekat GH je ograničen tako da je somatski rast fetusa samo delimično zavisna od GH. Ograničen efekat GH na stimulaciju sinteze i sekrecije IGF-I u fetalnom periodu verovatno je rezultat niskog nivoa ekspresije tkivnih receptora za GH i njihovog odloženog sazrevanja, kao i postreptorskih mehanizama ostvarivanja njihovog efekta, posebno na ćelijama jetre (Klempt i sar., 1993; Gluckman i Pinal, 2003). Poznato je da tireoidni hormoni stimulatивно deluju na sintezu i sekreciju GH na nivou hipotalamusa i hipofize i povećavaju ekspresiju mRNA za receptore GH rilizing hormona (Samuels i sar., 1989; Giustina i Wehrenberg, 1995; Korytko i Cuttler, 1997). Istraživanja sprovedena u in vitro uslovima ukazuju na pozitivan efekat

tireoidnih hormona na sintezu i sekreciju GH, gde je utvrđeno da T_3 povećava osetljivost hipofiznih somatotropa na GHRH (Vale i sar., 1983; Geary i sar., 1989). Näntö-Salonen i saradnici (Näntö-Salonen i Rosenfeld 1992 ; Näntö-Salonen i sar. 1993) su utvrdili da kod pacova sa indukovanim hipotireoidizmom tokom neonatalnog perioda, tireoidni hormoni mogu imati direktan ili indirektan t.j. GH nezavisni efekat na aktivnost somatotropne osovine, koji je takođe u korelaciji sa starošću životinje.

Radovi na neonatalnim pacovima sa indukovanom hipotireozom ukazuju na mogućnost uticaja tireoidnih hormona na ekspresiju mRNA IGF-I u jetri mehanizmom regulacije GH kako i efekat na aktivnost somatotropne osovine kroz uticaj ekspresije IGF-IR na hipofizne somatotrope (Harakawa i sar., 1990; Matsuo i sar., 1990). Efekat tireoidnih hormona na ekspresiju mRNA IGF-I kod pacova sa indukovanom hipotireozom opisali su i Ramos i saradnici (1998), koji su utvrdili da je hipotireozno stanje dovelo do značajnog pada ekspresije mRNA za IGF-I u tkivu jetre, koncentracije IGF-I i insulina u serumu, pri čemu ukazuju na jaku pozitivnu korelaciju između insulina i IGF-I u neonatalnom periodu. Kasnije isti autori (Ramos i sar., 2001) su utvrdili niske koncentracije IGFBP-3 kod tireoidektomisanih pacova, dok su Näntö-Salonen i saradnike (1993) a kasnije i Santana-Farré i saradnici (2012), utvrdili prolongiranu ekspresiju mRNA za IGFBP-2 u jetri i visoke koncentracije IGFBP-2 u serumu hipotireoznih pacova u neonatalnom periodu. In vitro istraživanja pokazala su da tireoidni hormoni imaju direktan pozitivan efekat na ekspresiju mRNK za IGFBP-2 na kulturi ćelija jetre, dok je u in vivo uslovima insulin, zavisno od tireoidnog statusa jedinke, značajan regulator ekspresije mRNK za IGFBP-2 (Böni-Schnetzler i sar., 1990).

2.6.2. Uticaj tireoidne osovine na koncentracije insulina i glukoze

Koncentracija insulina u krvi teladi u prvim satima nakon rođenja, održava se na niskom nivou sve do prvog unosa kolostruma, kada počinje da raste (Hammon i Blum, 1998; Kirovski i sar., 2011). Preprandijalne niske vrednosti insulina prate niske vrednosti glikemije i smatraju se protektivnim mehanizmom, koji ima za cilj održavanje fiziološke koncentracije glukoze u periodu do prvog unosa kolostruma. Hipoglikemija i niske koncentracije insulina, uz povećane koncentracije kateholamina, praćene su i povećanjem koncentracije glukagona koji je primarni stimulator glikogenolize i

mobilizacije glikogena u jetri novorođenčadi. Povećani odnos glukagon/insulin nakon rođenja troši rezerve glikogena u jetri, pri čemu je održavanje glikemije unutar fizioloških granica omogućeno i aktivacijom mehanizama glukoneogeneze (Girard, 1989). Unos kolostruma takođe povoljno utiče i na povišenje koncentracije glukagona u krvi teladi, najverovatnije preko bioaktivnih supstanci koje se u njemu nalaze. Bloom i saradnici (1981) utvrdili su visoke koncentracije glukagona i niske koncentracije insulina kod neonatalne teladi u prvih 24 sata nakon rođenja. Tireoidni hormoni regulišu sintezu glikogena uticajem na aktivnost enzima glikogen-sintaza u ćelijama jetre (Bollen i Stalmans, 1988). Hipotireoza dovodi do pada nivoa deponovanog glikogena u hepatocitima, ukoliko je organizam u stanju gladovanja, dok u stanju optimalne snabdevenosti energijom ne utiče značajnije na količinu glikogena deponovanog u tkivu jetre (Fowden i sar., 2001). Istraživanja na fetusima jagnjadi u završnoj fazi graviditeta ukazuju na postojanje direktnih i indirektnih mehanizama kojima tireoidni hormoni utiču na deponovanje glikogena u tkivu jetre, skeletnim mišićima i srcu (Forhead i sar. 2009).

Uzimanje kolostruma dovodi do povišenja koncentracije insulina, kao odgovor na unos nutritivnih komponenti kolostruma i porasta glikemije. Porast koncentracije insulina u serumu teladi je rezultat pankreasne sekrecije, uzimajući u obzir da je resorpcija insulina iz kolostruma putem crevnog epitela kod teladi ograničena (Grütter i Blum, 1991). Hammon i saradnici (2000) ukazuju na uticaj pravovremenog uzimanja kolostruma na postprandijalne koncentracije insulina. Novija istraživanja ukazuju na mogućnost značajnije resorpcije insulina iz digestivnog trakta teladi nakon uzimanja kolostruma. Naime, nakon peroralnog davanja insulina ustanovljeno je povišenje koncentracije insulina u serumu novorođene teladi, što ukazuje na mogućnost postprandijalnog održavanja stabilne koncentracije insulina, uzimajući u obzir da mehanizmi sekrecije insulina kod novorođene životinje nisu u potpunosti razvijeni (Kirovski i sar.2008; Kirovski i sar 2011; Gutter i Blum 1991).

Hammon i Blum (1998) su utvrdili da značajno postprandijalno povišenje insulina počinje da postoji od drugog dana nakon početka unosa kolostruma. Kirovski i saradnici (2011) utvrdili su da postprandijalno povećanje insulinemije tokom prvih 32 sata nije bilo značajno u odnosu na preprandijalne vrednosti, nasuprot glikemiji, kod koje je ustanovljeno statistički značajno povišenje nakon unosa kolostruma. Povećanje

koncentracije glukoze nakon unosa kolostruma nastaje kao rezultat povećane digestije laktoze i resorpcije nastale glukoze. Hammon i saradnici (2013) navode da unos laktoze nije jedini mehanizam koji obezbeđuje dovoljne koncentracije glukoze u serumu teladi tokom neonatalnog perioda, uzimajući u obzir njen relativno nizak sadržaj u kolostrumu, koji sadrži visoke koncentracije mlečne masti i proteina. Glukoneogeneza je mehanizam koji obezbeđuje oko 75% ukupne koncentracije glukoze koje su potrebne u neonatalnom periodu (Donkin i Hammon, 2005), odnosno da je i kod neonatalne teladi (iako se nalaze u nepreživarskoj fazi i glikemija im je značajno viša u odnosu na odrasle preživare) osnovni izvor glukoze u krvi. Steinhoff-Wagner i saradnici (2011) ukazuju na značaj maturacije prenatalnih mehanizama endogene produkcije glukoze i neonatalnih endokrinih promena koje zavise od unosa kolostruma u održavanju optimalne koncentracije glukoze tokom neonatalnog perioda.

Endogena produkcija glukoze nalazi se pod direktnim uticajem koncentracije tireoidnih hormona u krvi jedinke. Tiroksin direktno potencira glukoneogenezu kroz stimulaciju genske ekspresije ključnih enzima glukoneogeneze (Park i sar., 1997). Produkcija tireoidnih hormona je esencijalnog značaja u maturaciji procesa glukoneogeneze kod fetusa i neonatalnih jedinki i nalazi se pod direktnim uticajem energetskog metabolizma u završnoj fazi graviditeta. Indukcija hipotireoidizma tireoidtomijom fetusa ima za rezultat značajno smanjenje intenziteta glukoneogeneze, i to preko smanjenja ekspresije gena za ključne enzime glukoneogeneze i njihove aktivnosti u target tkivima (Fowden i sar., 2001). Tireoidni hormoni svoj uticaj na glikemiju ispoljavaju direktnim putem, i to preko svog uticaja na koncentraciju insulina. Naime, ustanovljeno je da tireoidni hormoni potenciraju sintezu i sekreciju insulina, kroz podsticanje postnatalne maturacije beta ćelija endokrinog pankreasa, kao i pojačanu osetljivost perifernih tkiva na njegovo delovanje, što je potvrđeno u in vitro i in vivo ogledima (Aguayo-Mazzucato i sar., 2013; Taguchi i sar., 2010). Tireoidni hormoni regulišu periferno iskorištavanje glukoze tako što intenziviraju njeno iskorištavanje u tkivima, imajući generalno anabolički efekat. U ispitivanjima sprovedenim na ćelijama mrkog masnog tkiva pacova, utvrđeno je da se nakon tretmana tiroksinom na ćelijama povećava ekspresija GLUT4 transportera za glukozu, kao i ukupan transport glukoze kroz ćelijsku membranu (Shimizu i Shimazu, 2002).

Adrenergični sistem i povećane koncentracije kateholamina u periodu oko rođenja utiču na održavanje postnatalne homeostaze glukoze i intenzitet neonatalne glukoneogeneze u tkivu jetre (Hammon i sar., 2013). Novija istraživanja ukazuju na ekspresiju adrenergičnih receptora sa visokim afinitetom vezivanja u jetri neonatalne teladi, koja je u pozitivnoj korelaciji sa unosom kolostruma i povezuje se sa regulacije endogene produkcije glukoze u tkivu jetre (Ontsouka i sar., 2006; Carron i sar., 2005; Schäff i sar., 2014).

Kirovski i saradnici (Kirovski i sar., 2011) su tokom neonatalnog perioda, pre uzimanja kolostruma, utvrdili značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracije glukoze i kortizola ($r^2=0.854/30\text{min}$; $r^2=0.724/60\text{min}$). Istraživanja koja su sproveli Hammon i saradnike (2003) i Scheuer i saradnike (2006) pokazala su da upotreba deksametazona ima inhibitorski efekat na mehanizme endogene produkcije glukoze i glukoneogenezu, tako da je povećanje glikemije nakon njegove aplikacije rezultat periferne insulinske rezistencije tkiva i smanjenja periferne utilizacije glukoze. Schäff i saradnici (2014) su utvrdili povezanost aktivnosti enzima glukoneogeneze i ekspresije receptora za glukokortikosteroide u tkivima, ukazujući na značaj uzimanja kolostruma za stepen maturacije u ekspresiji i afinitet vezivanja receptora za glukokortikosteroide u jetri novorođene teladi (Schäff i sar., 2015).

2.6.3. Tireoidna osovina i kortizol

Veissier i saradnike (1999) navode da hipofiza kod teladi ima veliki kapacitet produkcije ACTH, ali da je sekrecija kortizola niža u poređenju sa drugim vrstama, što se tumači niskom senzitivnošću na ACTH ili niskim kapacitetom za sekreciju kortizola. Povećanje koncentracije kortizola u serumu fetusa, karakteristično je u završnoj fazi graviditeta, posebno u poslednjih 7 do 9 dana pre partusa (Taverne i sar., 1988). Povišenje koncentracije kortizola predstavlja signal koji indukuje porođaj i utiče na maturacione procese tokom perinatalnog perioda, a time omogućava funkcionalnu adaptaciju organizma, potrebnu za ekstrauterini opstanak (Hillman i sar., 2012). Telad se rađaju sa visokom koncentracijom kortizola, koja tokom prvih sati nakon rođenja ima tendenciju opadanja (Lee i sar., 1995; Stojić i sar., 2002; Kirovski i sar., 2011). Hristov i Bešlin (1991) navode da koncentracija kortizola u plazmi kod teladi neposredno posle rođenja iznosi $12,1 \pm 1,1 \text{ ng}/100\text{ml}$, a zatim se naglo smanjuje na $4,9 \pm 1,1 \text{ ng}/100\text{ml}$.

Visoke koncentracije kortizola u periodu oko rođenja u literaturi se najčešće povezuju sa stresom i aktivacijom adrenalne osovine (Jacob i sar., 2001). Povećanje koncentracije kortizola praćeno je i povećanjem koncentracije kortizol-vezujućih globulina (Ballard i sar., 1982). Stojić i saradnike (2002) navode da biološku aktivnost ispoljavaju jedino slobodne frakcije kortizola. Uzimajući u obzir visoke koncentracije kortizola u serumu majke u vreme porođaja, istraživanja koja su sproveli Hoffman i saradnike (1976), ukazuju na minimalan placentarni transfer kortizola između majke i ploda. Nakon porođaja dolazi do postepenog opadanja koncentracije kortizola u krvi teladi, što je potencirano unosom kolostruma i uslovljeno energetske statusom jedinice, odnosno smanjenjem intenziteta stresogene reakcije (Hammon i sar., 1998; Stojić i sar., 2002). Niske koncentracije kortizola u periodu oko teljenja Schmidt i saradnike (Schmidt i sar., 2004) povezuju sa trajanjem perioda gestacije i stepenom prenatalne maturacije adrenokortikalnog sistema kod prevremeno rođene teladi. Kirovski i saradnici (2009) utvrdili su značajnu negativnu korelaciju između telesne mase teladi i koncentracije kortizola ($r = -0.592$), i zaključuju da su telad manje telesne mase podložnija delovanju stresogenih faktora.

Visoka koncentracija kortizola u periodu oko rođenja je suštinskog značaja za perinatalnu maturaciju mnogih organa i organskih sistema, i neophodna je za opstanak novorođene životinje (Liggins, 1994). Prenatalni porast koncentracije kortizola se smatra rezultatom maturacionog efekta glukokortikoida i pozitivnim efektom kortizola na fetalnu adrenalnu osovinu u završnoj fazi gestacije (Naaman Répérant i Durand, 1997). Kortizol krajem graviditeta indukuje promene metabolizma tireoidnih hormona, tako što povećava ekspresiju i aktivnost dejodinaze tipa 1 u ćelijama jetre, bubrega i masnom tkiva, dok snižava aktivnost dejodinaze tipa 3 u bubrezima i placenti (Forhead i sar. 2006), što ima za posledicu porast koncentracije T_3 . Statistički značajnu korelaciju između koncentracija T_3 i kortizola na rođenju kod novorođene teladi utvrdili su Nikolić i saradnici (1996). Forhead i saradnici (1998) utvrdili su da povećanje koncentracije T_3 uz povećanje koncentracije kortizola dovodi do pada ekspresije mRNK za IGF-II u jetri fetusa ovce na kraju gestacije. Isti autori ukazuju da kortizol, pored toga što povećava koncentraciju T_3 , takođe povećava i ekspresiju receptora za tireoidne hormone u jetri, što povezuju sa indirektnim negativnim efektom kortizola na ekspresiju mRNK za IGF-II na kraju gestacije. Povećana kortizolemija krajem gestacije značajna je za perinatalnu

maturaciju somatotropne osovine. Berier i saradnici (2000), navode da koncentracija kortizola u perinatalnom periodu ima ključnu ulogu u povećanju ekspresije GH receptora u jetri i povećanju koncentracije IGF-I.

Efekat kortizola na termogenezu u mrkom masnom tkivu i ekspresija UCP1 (uncoupling protein 1), ostvaruje se indirektnim mehanizmom, kroz delovanje kateholamina i tireoidnih hormona. Kortizol doprinosi povećanju koncentracije kateholamina, koji putem β -adrenergičnog mehanizma stimulišu ekspresiju i aktivnost UCP1 u mrkom masnom tkivu (Mory i sar., 1984). Drugi način je kroz delovanje tireoidnih hormona stimulišu energetske metabolizam u mitohondrijama uz gensku stimulaciju ekspresije UCP1 molekule, stabilizacija UCP1 i povećanje UCP1 u mrkom masnom tkivu (Guerra i sar.1996 ; Bassett i sar.2003).

2.6.4. Tireoidna osovina i leptin

Značajna uloga u postnatalnom energetske metabolizmu i termogenezi kroz regulaciju unosa hrane, metabolizam glukoze i razvoj intestinalnog sistema pripisuje se leptinu, tkivnom hormonu, koji se pored masnog tkiva sintetiše i u mlečnoj žlezdi i nalazi se u velikim koncentracijama u kolostrumu (Casabiell i sar., 1997; Pinotti i Rosi, 2006). Kod neonatalne teladi koncentracija leptina je zavisna od dužine trajanja graviditeta, stepena telesne maturacije i unosa kolostruma. Blum i saradnike (2005) utvrdili su da je koncentracija leptina kod teladi na teljenju između 4.0 i 5.0 ng/ml. Da je masno tkivo primarni izvor leptina u serumu neonatalne teladi, i pored mogućnosti resorpcije iz kolostruma, ukazuje to da povećanje leptinemije u neonatalnom periodu nastaje postepeno tokom nekoliko dana nakon prvog unosa kolostruma (Hammon i sar., 2013). Istraživanja kod novorođene jagnjadi pokazala su da se regulacija sekrecije leptina nakon rođenja ostvaruje pomoću kortizola, insulina, tireoidnih hormona i IGF-I. Long i saradnici (2013) navode da povećane koncentracije kortizola i insulina, pripremaju fetalno masno tkivo za postnatalnu sekreciju leptina. Pozitivni efekat IGF-I na sekreciju leptina ostvaruje se kroz stimulaciju proliferacije i diferencijacije masnog tkiva, dok su povećane koncentracije T_3 , kao rezultat efekta kortizola na konverziju T_4 u T_3 , pokazale inhibitorni efekat na sekreciju leptina. Prema tome, povećanje koncentracije leptina u prvim danima nakon unosa kolostruma, povezuje se sa već uspostavljenim metaboličkim i energetske statusom novorođene životinje. Sa druge

strane, istraživanja ukazuju na stimulativni efekat leptina na koncentraciju tireoidnih hormona. Naime, leptin povećava produkciju tireoidne hormone indirektnim putem, stimulacijom sekrecije TRH (Guo i sar., 2004). Novija in vitro istraživanja ukazuju da je potencirajući efekat leptina na sekreciju TSH zavisna od koncentracije leptina (Radwanska i Kosior-Korzecka, 2014). Niske koncentracije leptina pokazale su stimulativni efekat na sekreciju TSH. Svoje efekte leptin ostvaruje prisustvom leptinskih receptora na ćelijama hipotalamusa, hipofize i tireoidee (Guo i sar., 2004; Vicente i sar., 2004; Nowak i sar., 2002).

2.6.5. Koncentracija ukupnih proteina, globulini i tireoidna osovina

Telad se rađaju sa niskim vrednostima koncentracije ukupnih proteina, koje iznose oko 50-70g/l, nasuprot 60-80g/l kod odraslih jedinki (Kraft i Dürr, 1999). Iskorištavanje proteina u procesima glukoneogeneze i sinteze tkivnih proteina tokom prvih 24 sata neonatalnog života doprinosi održavanju niskih vrednosti koncentracije neimunoglobulinske frakcije proteina u serumu (Quigley i sar., 2002). Istraživanja ukazuju na korelaciju između koncentracije ukupnih proteina i koncentracije imunoglobulina u serumu teladi. Visoke koncentracije imunoglobulina u kolostrumu (oko 100g/l, Gomes i sar., 2011) i mogućnost intenzivne resorpcije u prvih 6 sati nakon rođenja (Marx i Stott, 1979) dovode do značajnog povećanja koncentracije proteina u serumu (do 80.5% u prvih 24 sata) u odnosu na vrednosti pre uzimanja kolostruma (Quezada-Tristán i sar., 2014). Nakon unosa kolostruma u serumu se primarno povećavaju koncentracije IgG1, a kasnije i IgM, što je rezultat većeg procenta resorpcije IgG1 u odnosu na IgM i kraćeg vremenskog perioda resorpcije IgM u odnosu na IgG1 (Cabello i Levieux, 1980). Određivanje koncentracije ukupnih proteina u prvoj nedelji starosti može biti indikator efikasnosti unosa i resorpcije kolostruma kod teladi. Za minimalne vrednosti resorpcije IgG1, koji ukazuju na efikasan transfer imunoglobulina i efikasnu kolostralnu zaštitu, smatraju se koncentracije od 5 do 10g/l, t.j potrebno je najmanje 100g/l IgG1 u kolostrumu da bi se obezbedio optimalni pasivni transfer za telad prosečne telesne težine od 45 kg (Radostits i sar., 2007). Ovo ukazuje da postoji čvrsta veza između koncentracije imunoglobulina u kolostrumu, pravovremenog uzimanja optimalne količine kolostruma i koncentracije imunoglobulina u serumu teladi nakon rođenja.

Povećanje koncentracije ukupnih proteina tokom prve nedelje neonatalnog života, pored transfera imunoglobulina iz kolostruma u prvih 24 sata, nastaje i kao rezultat povećanja sinteze albumina u jetri novorođenčadi (Nussbaum i sar., 2002). Sinteza albumina dominantno se odvija u jetri i njen intenzitet zavisi od stepena maturacije i funkcionalne aktivnosti jetre. Tóthová i sar (2014) navode da su albumini dominantna proteinska frakcija kod teladi u periodu mlečne ishrane, ali su takođe utvrdili i relativno visoke koncentracije α 1 globulina i relativno niske koncentracije β 2 globulina u odnosu na ostale proteinske frakcije. Isti autori utvrdili su i povećanje koncentracije γ -globulinske frakcije sa starosti teladi, što povezuju sa maturacijom procesa absorpcije u intestinalnom sistemu. Niže koncentracije γ -globulina kod mlađe teladi, Chaudhay i saradnici (2003) objašnjavaju činjenicom da je imunološki sistem u najranijem periodu nakon rađanja nedovoljno zreo za optimalnu sintezu globulina. Prema tome, povećanje koncentracije γ globulina je rezultat maturacije imunološkog sistema i veće ekspozicije organizma faktorima spoljašnje sredine (Kaneko, 2008).

Stepen resorpcije imunoglobulina iz kolostruma u prvih 24 sata nakon rađanje može se smatrati indikatorom stepena maturacije intestinalnog sistema, što je pozitivno regulisano direktnim uticajem IGF sistema i kortizola (Georgiev i sar., 2003; Whitaker i sar., 1996). Naime, veće koncentracije kortizola u perinatalnom periodu i maturacija somatotropne osovine omogućavaju efikasnu resorpciju imunoglobulina. Telad se rađaju sa relativno maturiranim gastrointestinalnim sistemom, uzimajući u obzir efekte IGF-II na razvoj gastrointestinalnog sistema tokom prenatalnog perioda i prisustvo mRNA za IGF-I i IGF-II, kao i receptora za IGF-I, IGF-II i insulin na intestinalnoj mukozu u perinatalnom periodu (Georgiev i sar., 2003; Georgieva i sar., 2003). Postnatalno, nutritivne i nenutritivne komponente kolostruma indukuju drastične morfološke i funkcionalne promene na gastrointestinalnom sistemu, koje se odnose na procese maturacije (Blum, 2006). Resorpcija imunoglobulina u prvim satima nakon rođenja takođe je omogućena i ograničenom sekrecijom digestivnih enzima i relativno visokim pH sadržaja abomazusa, što takođe smanjuje enzimsku aktivnost (Guilloteau i sar., 2009). Efekat tireoidnih hormona na absorpciju imunoglobulina istraživali su Cabello i Levieux (1978), koji su utvrdili negativnu korelaciju između koncentracije tireoidnih hormona, posebno tiroksina i vremena postizanja maksimalne vrednosti koncentracije IgG. Isti autori (Cabello i Levieux, 1980) su u svom kasnijem istraživanju

dobili slične rezultate kod novorođene teladi povećanjem koncentracije T_4 parenteralnim davanjem, pri čemu navode da tiroksin verovatno smanjuje period apsorpcije imunoglobulina u crevima. Inhibitorni efekat T_4 na resorpciju imunoglobulina i pad koncentracije ukupnih proteina utvrdili su i Šlebodziński i saradnici (1995) nakon peroralnog davanja T_4 i T_3 . Suprotno T_4 , ovi autori su utvrdili da peroralno davanje T_3 stimuliše resorpciju globulina. Obzirom na činjenicu da kolostrum sadrži veće koncentracije T_3 u odnosu na T_4 , evidentan je značaj prisustva T_3 u kolostrumu u optimalnoj koncentraciji i njegovog uticaja na resorpciju imunoglobulina u fiziološkim uslovima.

2.6.6. Aktivnost tireoidne osovine i njen uticaj na koncentraciju lipida u krvi teladi

Metaboličko prestrojavanje organizma teladi nakon rođenja u pogledu odnosa koncentracija pojedinih frakcija lipida u krvi u velikoj meri zavisi od unosa kolostruma i ima za cilj obezbeđivanje optimalne energetske efikasnosti u neonatalnom periodu. Naime, nakon rođenja procesi lipomobilizacije i oksidacije masnih kiselina dominiraju nad procesima lipogeneze, koji su bili izraženi tokom prepartalnog perioda. Telad se rađaju sa visokim koncentracijama neestifikovanih masnih kiselina (NEFA), nastalim kao rezultat intenzivne endogene lipomobilizacije (Lents i sar., 1998; Rauprich i sar., 2000; Kühne i sar., 2000), sa ciljem da se obezbedi izvor energije do unosa kolostruma. Neadekvatan unos kolostruma i negativni energetske bilans dovode do održavanja visoke koncentracije NEFA (Hadorn i sar., 1997). Sa druge strane, endokrino prestrojavanje nakon rođenja, t.j. visok odnos glukagon : insulin takođe stimuliše procese lipolize, oksidacije masnih kiselina i ketogeneze. Ketogeni kapacitet kod neonatalne teladi je relativno nizak, uzimajući u obzir niske koncentracije β hidroksibutirata i acetoacetata u neonatalnom periodu (Hammon i sar., 2012). Tokom ranog neonatalnog perioda visoke koncentracije TSH potenciraju lipolizu u masnom tkivu, posebno kada je u pitanju mrko masno tkivo, kao značajan depo energije novorođenih životinja. Lipolitički efekat TSH je kratkotrajan (Marcus i sar., 1988) i kao takav postoji neposredno nakon rođenja, da bi u kasnijem uzrastu i kod odraslih jedinki imao suprotan efekat (Jiang i sar., 2015). Pozitivni lipolitički efekat tiroksina kod neonatalne teladi utvrdili su i Šlebodziński i saradnici (1995) nakon peroralnog davanja T_4 . Istraživanja sprovedena kod neonatalne jagnjadi ukazuju na posredni lipolitički

efekat tireoidnih hormona, jer je davanje tireoidnih hormona kod jagnjad sa indukovanom hipotireozom nakon rođenja dovelo do aktivacije lipolitičkih procesa posredovanih kateholamina (Wrutniak i Cabello, 1986)

Na samom početku laktacije u kolostrumu ima oko 6.7% masti, da bi njihova koncentracija tokom prve nedelje laktacije opadala i dostigla oko 4% sedmog dana nakon teljenja, pri čemu 90% od toga čine trigliceridi (Kirovski i sar., 2014; Girard i sar., 1985). Značajno povećanje koncentracije triglicerida, fosfolipida i holesterola povezuje se sa pravovremenim uzimanjem optimalne količine kolostruma i ukazuje na veliki kapacitet digestivnog trakta za resorpciju masti (Blum i sar., 1997). Maksimalne vrednosti triglicerida u serumu neonatalne teladi kreću se u raspon od 0.04-0.05 mmol/l (Knowles i sar., 2000). Maturacija mehanizma resorpcije značajno zavisi od unosa kolostruma (Kühne i sar., 2000). Aktivnost pankreasne lipaze odmah po rođenju je relativno niska i povećava se nakon unosa kolostruma sa jedne strane, dok efikasnost same resorpcije zavisi od funkcionalne maturacije jetre i dostupnosti soli žučnih kiselina (Nussbaum i sar., 2002). Unos kolostruma takođe povećava koncentracije holesterola, HDL i LDL lipoproteina. Poznato je da je LDL kod teladi dominantni lipoprotein tokom fetalnog perioda, da bi tu ulogu nakon rođenja preuzeo HDL, posebno nakon unosa kolostruma. Herosimczyk i saradnici (2013) su utvrdili povećanje koncentracije HDL i LDL tokom prve nedelje postnatalnog života, što povezuju sa progresivnim transfera holesterola sa LDL na HDL lipoproteine.

Poznato je da tireoidni hormoni regulišu metabolizam holesterola u jetri, tako što podstiču njegov katabolizam i izlučivanje putem žuči (Gullberg i sar., 2002). Kaneko i saradnici (2008) ukazuju na hipoholesterolemičan efekat tiroksina. Negativnu korelaciju između koncentracija holesterola i tiroksina utvrdili su Georgieva i Georgiev (1997) kod krava u peripartalnom periodu, dok su do sličnog nalaza za telad u neonatalnom periodu došli Irmak i saradnici (Irmak i sar., 2004)

2.7. Smanjena funkcija tireoidee – hipotireoza

Stanje koji dovodi do smanjenje sinteze i sekrecije tireoidnih hormona naziva se hipotireoza ili hipotireoidizam. Kliničko stanje koje je rezultat poremećaja funkcije tireoidee predstavlja primarni hipotireoidizam i praćeno je povećanjem koncentracije TSH u krvi. Ukoliko hipotireoza nastane zbog poremećaja sinteze i sekrecije TRH ili

TSH na nivou hipotalamusa, odnosno hipofize, govorimo o sekundarnom, centralnom ili hipotropnom hipotireoidizmu. Centralni hipotireoidizam može biti rezultat poremećaja funkcije hipotalamusa, odnosno smanjene sinteze i sekrecije TRH ili funkcionalnog pituitarnog poremećaja i niske sinteze i sekrecije TSH. Periferni ili tercijarni hipotireoidizam nastaje kao rezultat poremećaja transporta, metabolizma i aktivnosti tireoidnih hormona u tkivima (Braverman i Cooper, 2012). Stanje niske koncentracije tireoidnih hormona u periodu neposredno pre i posle rođenja definiše se kao kongenitalni hipotireoidizam, i može nastati kao rezultat poremećaja fetalnog rasta i razvoja tireoidne žlezde, ili poremećaja biosinteze tireoidnih hormona (Rastogi i LaFranchi, 2010).

Pod prirodnim uslovima, hipotireoza kod preživara je uglavnom rezultat nedostatka joda u ishrani ili unosa prirodnih goitrogena. Hetzel i Mano (1989) navode da je kod gravidnih ovaca koje su hranjene obrokom deficitarnim u jodu, došlo do opadanja koncentracije tireodnih hormona, porasta koncentracije TSH i smanjenja ekskrecije joda putem urina, kao i visok procenat pobačaja i mrtvorodenja, dok je kod njihove jagnjadi ustanovljena smanjena masa, spora maturacija kostiju, zglobova i deformiteti lobanje, kao i gušavost (već od 70. dana graviditeta). Hiperplastične promene na tkivu tireoidee ustanovljene su već 56. dana gestacije, a ovi autori su opisali i promene na nervnom tkivu, koje su se manifestovale hipoplazijom moždanog tkiva.

Miller i saradnici (1988) navode da dnevna produkcija T_4 kod odraslih krava koje nisu u laktaciji i jedinki u fazi rasta iznosi 0.2-0.3 mg/100kg telesne mase, što odgovara količini od 0.13 do 0.2 mg joda. Hetzel i Maberly (1986) navode da optimalne koncentracije joda u tireoideji kod goveda iznose 600 do 1500 $\mu\text{g/g}$ tkiva. Od ukupne količine joda koja se unosi hranom, približno 30% koristi tiroidea za sintezu tireoidnih hormona, s time da 15% od ukupnog joda koji se koristi za sintezu tireoidnih hormona potiče iz razloženih molekula tireoidnih hormona, tj. organizam u velikoj meri "ekonomiše" jodom, odnosno može se reći da ga reciklira. Ovi autori procenjuju da su dnevne potrebe joda kod krava oko 0.6 mg joda na kg suve materije hrane, dodajući da su kod krava u laktaciji one oko 2.5 puta veće, jer približno 10% ukupnog joda prelazi u mleko (Miller i sar., 1988; Sanchez, 1995). Kada su pitanju potrebe za jodom kod teladi, isti autori navode da se kreću oko 0.25 mg/kg suve materije hrane.

Nedostatak joda javlja se kao primarni i sekundarni deficit. Primarni deficit je rezultat niske koncentracije joda u organizmu, najčešće kao posledica ishrane životinja biljnim hranivima koja potiču od terena siromašnih u jodu (Sinovec i Jovanović, 2002; Grubić i Adamović 2003; Anderson i sar., 2007). Sekundarni deficit je rezultat ishrane životinja hranom koja u svom sastavu sadrži materije koje imaju antitiroidne osobine ili goitrogene materije. Goitrogeni efekat mogu ispoljavati organska jedinjenja koja sadrže sumpor, tiocijanat, izotiocijanat, goitrin, disulfidi, polifenoli, polihidroksifenoli i derivati fenola, estri ftalata i njihovi metaboliti, polihlorirani (PCB) i polibromirani bifenile (PBB), organohlorni preparati (DDT), policiklični aromatični hidrokarbonati, neorganski jod u višku i litijum (Braverman i Cooper, 2012). Goitrogene materije mogu biti sastavni deo hrane ili dodaci hrani koje se koriste u ishrani životinja. Kod preživara unos prirodnih goitrogena je najčešće vezan sa ishranom biljkama koje pripadaju porodici kupusnjača *Brassicaceae* (*Cruciferae*), kao što su kupusna uljana repica (*Brassica napus*) i ogrštica (*Brassica rapa*), kelj (*Brassica oleracea* var. *sabellica*), koji u svom sastavu sadrže goitrogenu materiju glikozinolat (Kokić i Palić, 2012; Seimiya i sar., 1991). Glikozinolati su jedinjenja koja se nalaze u svim delovima biljaka, a oštećenja biljnih ćelija tokom obrade ili žvakanja hrane omogućava kontakt između glikozinolata i enzima β -tioglukozidaza-mirozinaza, koji se takođe nalazi u biljci, a proizvodi ga i mikroflora gastrointestinalnog trakta životinja. Tiocijanati i prekursori tiocijanata su produkti hidrolize glikozinolata, koji mogu dovesti do smanjenog iskorištavanja joda i preuzimanje joda u štitastu žlezdu (delujući kao kompetitivni substrat za TPO), tako da visoke doze tokom dužeg perioda mogu smanjiti nivo tireoidnih hormona (Vanden Bussche i sar., 2011). Preživari su, u poređenju sa ostalim vrstama, tolerantniji na glikozinolate, ali dugoročna ishrana hranom koja sadrži glikozinolate kod krava dovodi do smetnji u radu štitaste žlezde, smanjenja plodnosti i proizvodnje mleka (Ahlin i sar., 1994; Ingalls i Sharma, 1975).

Simptomi nedostatka joda mogu biti potencirani i ishranom deficitarnom, selenu, gvožđu i vitaminu A (Campos-Barros i sar., 1997; Zimmermann, 2006; Zimmermann, 2007). Nedostatak selena dovodi do smanjene aktivnosti dejodinaza i remeti periferni metabolizam tireoidnih hormona (Artur i sar., 1993; Beckett i sar., 1993). Nedostatak selena takođe dovodi do smanjenje aktivnosti glutacion peroksidaze, enzima koji štiti ćeliju od oksidativnih oštećenja (Schmutzler i sar. 2007). Vitamin A ima značajnu ulogu

u regulaciji koncentracije i metabolizma tireoidnih hormona, i to tako što njegove povećane koncentracije inhibiraju sintezu TSH preko supresija ekspresije TSH- β gena. Međutim, i deficit vitamin A dovodi do smanjenja sinteze tireoidnih hormona, kao rezultat smanjenog preuzimanja joda i sinteze tiroglobulina (Strum, 1979; Oba i Kimura, 1980).

Deficit joda je relativno česta pojava u intenzivnom uzgoju goveda, pre svega jer visoka proizvodnja mleka i intenzivno iskorištavanje u reprodukciji pred organizam životinja stavljaju veoma visoke metaboličke zahteve, koje često nije moguće zadovoljiti unosom hrane, odnosno sadržajem joda u obroku, što je posebno slučaj u područjima u kojima je tlo siromašno u jodu. Potrebe životinja za jodom u ovim regionima zadovoljavaju se obogaćivanjem hrane sa jodnim preparatima ili davanjem mineralnih suplemenata koje sadrže jod. Treba napomenuti i to da zadovoljenje potrebe joda kod životinje može indirektno biti uslovljeno i koncentracijom proteina u krvnoj plazmi, jer se jod u krvi transportuje vezan za proteine krvne plazme (Austin i sar., 1980). Hernandez i saradnici (1972) su merenjem koncentracije proteina koji vezuju jod (PBI) kod fetusa tokom trećeg trimestra gestacije i neonatalnog perioda kod teladi utvrdili da se koncentracije PBI nalaze u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom T₄. Isti autori utvrdili su maksimalne fetalne koncentracije PBI na kraju gestacije, koje su bile značajno veća u odnosu na vrednosti PBI u serumu majke.

Monitoring statusa joda u preživara ostvaruje se određivanjem koncentracije joda u serumu, koncentracije joda vezanog za proteine, koncentracije T₄ ili na osnovu prisustva strume (McDowell, 2003). Azuolas i Caple (1984) navode da određivanje koncentracije joda u serumu može biti korisnije od procene na osnovu koncentracije T₄ kod gravidnih jedinki, jer niske doze joda tokom graviditeta lako dovode do pojave gušavosti kod novorođenčadi dok serumske koncentracije T₄ majke istovremeno ne moraju biti izmenjene. Isti autori ukazuju da i pored toga što je koncentracija joda u mleku indikator unosa joda hranom, ipak sezonske varijacije laktacije i kvaliteta mleka utiču na preciznost određivanja statusa joda kod jedinke. Za adekvatni status joda kod goveda smatraju se vrednosti koncentracije joda u serumu od 10 do 40 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, proteinski vezanog joda od 4.6 do 12.8 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, koncentracije u mleku od 30-300 $\mu\text{g}/\text{L}$ i vrednosti koncentracije T₄ od 20–100 ng/mL (Puls, 1988).

Prilikom procene dobijenih vrednosti za koncentraciju tireoidnih hormona kod teladi nakon rođenja, treba imati u vidu da koncentracije variraju sa starošću jedinke, kao i u zavisnosti od ishrane i način gajenja. Srednje vrednosti za T_4 i T_3 kod teladi do 3 meseca starosti prema Larson i saradnicima (1995) iznose $8.21 \pm 2.10 \mu\text{g/dl}$ za T_4 i $1.50 \pm 0.48 \text{ ng/ml}$ za T_3 . Vrednosti T_4 i T_3 u prvih 6 meseci nakon rođenja ispitivali su Tancin i Cupka (1991) i utvrdili vrednosti za T_4 od 18.753 (prvi dan) do 4.782 $\mu\text{g/dl}$ (63 dan) i vrednosti za T_3 od 9.237 (prvi dan) do 0.904 ng/ml (118 dan). Vrednosti koncentracije koje su utvrdili Paulíková i saradnici (2011) kod teladi do 6 meseca starosti za T_4 iznose $9.06 \pm 1.835 \mu\text{g/dl}$ prvi mesec, $6.36 \pm 0.759 \mu\text{g/dl}$ sa 3 meseca starosti i $7.98 \pm 1.756 \mu\text{g/dl}$ sa 6 meseci starosti, a za T_3 , $2.64 \pm 0.915 \text{ ng/ml}$ prvi mesec, $1.67 \pm 0.230 \text{ ng/ml}$ sa 3 meseca starosti i $2.23 \pm 0.567 \text{ ng/ml}$ sa 6 meseci starosti. U literaturi se navodi da se serumske koncentracije T_4 ispod $1.56 \mu\text{g/dl}$ mogu smatrati indikatorom za dugotrajni nedostatak joda kod krava, ako se uzme da vrednost T_4 kod mlečne krave iznosi $3.60 \pm 1.10 \mu\text{g/dl}$ (Whittaker, 1999; Đurđević i sar., 1980).

Subklinički oblik deficita joda, gde izostaju kardinalne kliničke simptome (vrednosti koncentracije T_4 i T_3 kao i njihov odnos ne razlikuju se kod krave sa optimalnim zadovoljenje koncentracije joda), ima veći značaj kao uzrok fetalnog i neonatalnog morbiditeta i mortaliteta u odnosu na klinički oblik deficita joda. Tokom fetalnog perioda koncentracija tireoidnih hormona kod teladi je potpuno zavisna od sopstvene aktivnosti tireoidne osovine, imajući u vidu da je fetoplacentarna barijera nepropustljiva za tireoidne hormone majke. Sa druge strane, koncentracija joda u krvi majke je od suštinskog značaja za optimalno zadovoljenje fetalne potrebe jodom, a time i maturaciju i funkcionisanje tireoidne osovine, ako se zna da prihvatanje joda u fetalnoj štitastoj žlezdi nastaje već oko 60. dana gestacije (Knoeff i sar 1949). U prilog ovom je i istraživanje koje su sproveli McCoy i saradnici (McCoy i sar 1997), eksperimentalno indukujući deficit joda junica ishranom deficitarnom u jodu tokom zadnjih 4 do 5 meseca gestacije, gde su utvrdili da nedostatak joda dovodi do kliničkih i patoloških promena na tiroidei kod majke i teladi. Isti autori navode da subklinički oblik nedostatka joda kod novorođene teladi, kod kojih nastaju promene tiroideje ali su bez kliničke simptomatologije, može biti delimično kompenzovan adekvatnim snabdevanjem majke optimalnim koncentracijama selena. Naime, optimalne koncentracije selena u kombinaciji sa deficitom joda dovode do višekratnog povećanje

aktivnosti tiroksin dejodinaze, što omogućava intenzivnu konverziju T_4 u T_3 , a time i održavanje periferne koncentracije T_3 (Zadorski i sar., 1998).

Deficit joda ili hipotireozno stanje majke dovodi do rađanja slabo vitalne teladi, letargije, alopecije i poteškoća u uzimanju kolostruma. Hipotireoidizam kod novorođene teladi takođe se povezuje sa sindromom perinatalne slabosti teladi (Radostits, 2007). Nutritivni deficit joda dovodi do značajne modifikacije strukture i aktivnosti štitaste žlezde t.j. pojavu gušavosti ili strume. Gušavost je klinički termin koji opisuje ne-neoplastično i neinflamatorno povećanje tireoidee, koje nastaje kao rezultat hiperplazije folikularnih ćelija (Vegad, 2010). Promene tireoidee imaju za cilj održavanje adekvatne sekrecije tireoidnih hormona i u suštini su adaptivne prirode. Početne funkcionalne promene su povećanje preuzimanja joda u žlezdano tkivo, intenziviranje intratiroidnog jodnog metabolizma i primarna sinteza i sekrecija T_3 (povećanje sekrecije T_3 nasuprot sekrecije T_4). U cirkulaciji nastaje pad koncentracije T_4 , dok se nivo koncentracije T_3 održava (virtuelno nepromenjen T_3 u odnosu na koncentracije T_4). Povećana sekrecija TSH je rezultat aktivacije mehanizma negativne povratne sprege, kao rezultat smanjene koncentracije tireoidnih hormona u cirkulaciji. Tireotropna stimulacija dovodi do hipertrofije i hiperplazije epitelnih ćelija folikula (tireociti postaju cilindrični) i povećane vaskularizacije tkiva štitaste žlezde (Capen, 1995). Povećanje parenhima štitaste žlezde je kompenzatorni mehanizam, koji omogućava veće prihvatanje joda iz krvi kako bi se normalizirala koncentracija tireoidnih hormona i TSH. U prvo vreme postoji difuzno povećanje žlezde i ćelijska hiperplazija, dok kasnije, u hroničnom obliku deficita joda, nastaje povećanje folikula sa akumulacijom slabo jodiranog tiroglobulina. Ova akumulacija je rezultat smanjene aktivnosti proteaza koje prerađuju tireoglobulin. Povećanje štitaste žlezde može se lako primetiti kod dugotrajne i teže jodne deficijencije. Makroskopske i histološke promene tireoidee kod novorođene teladi sa deficitom joda i hipotireoidizmom opisali su Morinaga i saradnici (1990) i Seimiya i sari saradnici (1991), koji su makroskopskim pregledom utvrdili difuzno bilateralno povećanje žlezde sa težinom iznad 16g (masa tireoidee je ispod 10g, Scott i sar., 2011) i edem periglandularnog tkiva. Na osnovu histološke analize i stepena histoloških promena na tkivu tireoidee ovi autori kategoriziraju štitnjače u pet kategorija počevši od tireoidee bez osobitih promena, pa sve do izrazito značajnih histoloških promena njenog tkiva. Smyth i saradnike (1996) takođe ukazuju na povezanost intenziteta histoloških

promena sa masom žlezde i koncentracijom joda u žlezdi. Isti autori su kod većine teladi sa utvrđenom abnormalnosti tireoidee utvrdili i zastoj u maturaciji pluća i pojavu pneumonije, kao i niske koncentracije selena u bubrezima.

2.7.1. Indukcija hipotireoze

Istraživanja fiziologije razvoja i funkcije tireoidne osovine, kao i njenog uticaja na metabolički i endokrini status tokom fetalnog i neonatalnog perioda, uključuju i metode manipulacije aktivnošću tireoidne osovine majke i novorođene životinje. Poznato je da su tireoidni hormoni i aktivnost tireoidne osovine neophodni za pravilan razvoj fetusa, endokrinu i metaboličku adaptaciju u periodu rađanja, kao i rast i razvoj u postnatalnom periodu (Hernandez i sar., 1972; Kirovski i sar., 2011). Upravljanje aktivnošću tireoidee kod preživara ima za cilj identifikaciju karakteristika funkcioniranja tireoidne osovine, kao i kreiranje protokola za poboljšanje proizvodnih i reproduktivnih performansi jedinke i dobijanje zdravog i vitalnog potomstva (Huszenica i sar., 2002; Villar i sar., 2002).

Hipotireozno stanje može se indukovati tireoidektomijom ili aplikacijom različitih farmakoloških supstanci sa tireostatskim efektom (Villar i sar., 2002). Tireoidektomija je invazivan i radikalni metod, koji omogućava ireverzibilnu i potpunu eliminaciju tireoidnih hormona iz cirkulacije. Prisustvo ektopične lokalizacije tireoidnog tkiva i mogućnost lučenja izvesne količine tireoidnih hormona, kao i invazivnost metode, smatraju se za nedostatak ove metode upravljanja aktivnošću tireoidee. Hipotireoidno stanje izazvano tireoidektomijom dovodi do značajnih metaboličkih i endokrinih promena. Tireoidektomija je takođe praćena i uklanjanjem paratireoidnog tkiva, što vodi ka poremećaju metabolizma kalcijuma i fosfora. Nicholls i saradnici (1988) koristeći metodu tireoidektomije kod ovce ukazuju na uticaj tireoidnih hormona na sezonsku cikličnost ovarijalne aktivnosti. Parkinson i saradnici (1994) utvrdili su da tireoidektomija kod ovne dovodi do prekida sezonske cikličnosti sekrecije gonadotropina. McIntosh i saradnici (1983) su kombinacijom tireoidektomije majke pre koncepcije i tireoidektomije fetusa 98 dana gestacije, ukazali na značajniji efekat tireoidektomije u poređenju sa deficitom joda na razvoj nervnog sistema fetusa ovce. Komparativnim istraživanjem efekta tireoidektomije majke i indukcije hipotireoze davanjem PTU (propiltiouracil) na razvoj fetalne tireoidee kod pacova, Kawaoi i Tsuneda (1986),

utvrdili su da kod tireoidektomisane majke nastaje zastoj razvoja fetalne tireoideSe, dok PTU inducirani hipotireoidizam majke dovodi do morfološke i histološke promene tkivo tireoidee fetusa.

Veliki broj supstanci direktnim ili indirektnim putem mogu da inhibiraju sintezu, sekreciju i aktivnost tireoidnih hormona. Supstance sa antitireoidnim efektom mogu se podeliti na direktne inhibitore sinteze tireoidnih hormona i jonske inhibitore, koji blokiraju transportni mehanizam joda. Danas se u praksi najčešće koriste tioamidni derivati (propiltiouracil, metiltiouracil, tiourea, metamizol i karbamizol) koji u svom sastavu sadrže tioamidnu (S=C-N) grupu. Tioamidi inhibiraju aktivnost TPO, pri čemu blokiraju oksidaciju jodida i kovalentno vezivanje joda za tirozinske ostatke na molekulu Tg, odnosno sam proces organifikacije joda, a time i sintezu tireoidnih hormona (Taurog, 2000). Neki od tioamida, kao što je propiltiouracil, inhibiraju i perifernu enzimsku dejodinaciju T₄ u T₃, te opadanje periferne koncentracije hormona nastaje kada se iskoriste ranije formirani molekuli hormona odnosno rezerve jodiranog tireoglobulina (Taurog, 2000). Prema tome, vreme nastanka hipotireoznog stanja zavisi i od količine hormona deponovanih u folikulima tireoidee. Villar i saradnici (2002) navode da je u uslovima hipotireoze kod goveda aktivnost tireoidne DIO1 niska, za razliku od čoveka i glodara, te da izvor biološki aktivnog T₃ u hipotireoznom stanju kod goveda može biti tireoideja koja u tim uslovima povećava sintezu T₃ i/ili povećanje aktivnosti DIO1 u bubrezima ili jetra (Villar i sar., 2002).

Tioamidi imaju relativno kratak poluživot u cirkulaciji, a njihov klirens nastaje eliminacijom najvećim delom kroz urin, a manjim delom kroz intestinalni sistem. Koncentracija tioamida u mleku je relativno mala, tako da eliminacija kroz mleko ima manji značaj. Karakteristična je mogućnost akumulacije tioamidnih derivata u tkivu tireoidee, pri čemu stepen inhibicije sinteze tireoidnih hormona više zavisi od količine deponovanih tireoidnih hormona nego od koncentracije tioamida u plazmi. Akumulacija tioamida u štitastoj žlezdi omogućava i duži efekat, što je važno prilikom doziranja i održavanja hipotireoidnog stanja. Jodni deficit kod životinje inhibira proces akumulacije tioamida (Benker i Reinwein,1982). Nakon prekida davanje tioamida, njihov efekat prestaje za relativno kratko vreme, nakon čega sledi privremeno kompenzatorno povećanje koncentracije hormona (Rumsey i sar., 1985; Follet i Potts, 1990).

I pored toga što većina antitireoidnih preparata ima zajedničke karakteristike, prilikom odabira supstance za datom istraživanje treba imati u vidu razlike karakteristične za pojedine vrste životinja, starosne kategorije fiziološka stanja, kao i doziranje pojedinih preparata. Danas se za tretman hipertireoidizma humane populacije i malih životinja najčešće koriste PTU i metamizol (MMI).

Istraživanja farmakokinetike propiltiouracila (6-propil-2-metil-tiouracil) kod glodara i ljudi ukazuju na brzu resorpcija kroz gastrointestinalni sistem, tako da se maksimalne koncentracije u serumu mogu utvrditi već jedan do dva sata nakon davanja (Cooper i sar., 1982). Nakon resorpcije, PTU nalazi se 70 do 90% vezan za proteine plazme (Cooper, 2005). Serumske koncentracije PTU održavaju se približno 12 do 24 sata. Metabolizam propiltiouracila nastaje putem glukoronidacije u jetri, a 75 do 90% od ukupne koncentracije PTU u cirkulaciji eliminiše se urinom, u obliku propiltiouracil glukoronata (Sitar i Thornhill, 1972). Propiltiouracil prolazi kroz placentarnu barijeru. Ranija istraživanja u humanoj populacije ukazuju na manji placentarni transfer PTU za razlike od MMI, što je takođe potvrđeno i kod glodara (Marchant i sar., 1977). Ove razlike u dijaplacentarnom transferu su pripisivane nešto većem kapacitetu vezivanja PTU za proteine krvne plazme, njegove rastvorljivosti u mastima, dok Mortimer i saradnike (1997) nisu ustanovili značajnije razlike u dijaplacentranom transferu ove dve supstance. Horger i saradnici (1976) navode da propiltiouracil kod gravidnih ovaca može dovesti do inhibicije aktivnosti fetalne tireoidee i razvoja strume. U humanoj populaciji aplikacija PTU u cilju lečenje hipertireoidizma majke, preporučena je samo u početku gestacije, jer se u kasnijim fazama graviditeta kod fetusa javlja hipotireoza i hepatotoksičnost (Mandel i Cooper 200; Azizi i Amouzegar, 2011).

Efekat propiltiouracila je reverzibilan i dozno zavisian. Koncentracije od 1-2mg/kg tjelesne težine dovode do blagog pada koncentracije tireoidnih hormona, pre svega T₃, što je rezultat inhibicije aktivnosti DIO1 u perifernim tkivima (Rumsey i sar., 1985; Elsasser i sar., 1992). Koncentracija od 4 mg/kg tjelesne mase dovodi do inhibicije sinteze i sekrecije tireoidnih hormona na nivou tireoidee, kao i inhibicije periferne dejodinacije, pri čemu nastaje pad koncentracije tireoidnih hormona na svega 30% (Bernal, 1996; DeMoraes i sar., 1998; Elsasser i sar., 1992). Mlade životinje su osetljivije na dejstvo PTU u odnosu na starije, što je dokazano ogledima na pacovima i junadi (Kariya i sar., 1983; Rumsey i sar., 1985).

Istraživanja u humanoj populaciji ukazuju da su koncentracije PTU-a u mleku kod majke koje su uzimale preporučene terapijske doze niske i da u mleko prelazi svega 0.025% od unete količine PTU (Karras i Krassas, 2012), te da te količine ne ostvaruju negativan uticaj na odojčad koja su konzumirala takav kolostrum i mleko. Transfer PTU u mleko je uslovljen farmakokinetičkim osobinama, od kojih su najvažnije visoki procenat vezanog oblika za proteina plazme, kratak životni vek u serumu, niska liposolubilnost i visoki stepen jonizacije u plazmi (Wilson i sar., 1980). Istraživanje koje su sprovedeli Chanda i saradnici (1952), pokazalo je da tretman krava tiouracilom u dozi od 20mg/dan tokom 3 nedelje dovodi do smanjenja produkcije mleka, procenta mlečne masti, laktoze i fosfata, dok se istovremeno povećava koncentracija hlorida. Mleko krava tretiranih tiouracilom imalo je za 24% manji sadržaj askorbinske kiseline, kao i statistički značajno niži sadržaj aneurina. Značajan pad produkcije mleka nakon tretmana krava sa PTU u dozi od 4mg/kg telesne mase u periodu od 83 dana nakon telenja utvrdili su i Thrift i saradnici (1999a).

Propiltiouracil je, u niskim dozama koje dovode do blagog pada koncentracije T_3 , uz očuvanu koncentraciju T_4 i smanjenje bazalnog metabolizma, korišćen kao stimulator rasta (Rumsey i sar., 1985). Takođe, istraživanja sprovedena u uslovima hipotireoze indukovane davanjem PTU ukazuju na jasnu povezanost funkcije tireoidnih hormona i proizvodno-reproduktivnih osobina krava tovnih rasa (DeMoraes i sar., 1998; Thrift i sar., 1999a,b; Bernal i sar., 1999).

Metimazol (1-metilimidazol-2-tiol) i karbimazol (1-metil-2-imidazoltilol etil karbonat) su derivati tiouree koji se koriste u terapiji hipertireoidizma kod malih životinja, prvenstveno zbog manje izraženih neželjenih efekata u poređenju sa upotrebom PTU (Riviere i Papich, 2009). Ovi preparati koriste se u dozama koje su za 5 do 10 puta manje u odnosu na PTU. Karbimazol se u organizmu brzo i potpunosti pretvara u metimazol, ali mu je efekat dva puta slabiji u poređenju sa samim metimazolom, te su potrebne veće doze za postizanje željenog efekta (Riviere i Papich 2009). Metimazol se takođe koristi i za tretman hipertireoidizma kod ljudi, i kod gravidnih majki se, iako se smatra bezbednim za upotrebu u trudnoći, mogu pojaviti i neželjeni efekti, kao što je aplazija kože na glavi fetusa (Mandel i Cooper, 2001). MMI se nakon peroralnog unosa brzo resorbuje u crevima, ali se, za razliku od PTU, u krvi nalazi samo u slobodnom obliku, što utiče i na njegov poluživot u cirkulaciji, koji iznosi

4 do 6 sati, kao i na njegov terapijski efekat (Cooper 2005). Metimazol se najvećim delom izlučuje putem mokraće, a kao mali molekul sposoban je da prolazi kroz placentarnu barijeru, kao i u mleko u kome se nalazi u niskim koncentracijama. Metamizol, za razliku od PTU, ne utiče na aktivnost dejodinaza u perifernim tkivima, odnosno svoj antitireoidni efekat ostvaruje samo na nivou tireoidee. Polazeći od toga, Villar i saradnici(2002) navode da mu je sposobnost za indukciju hipotireoze kod preživara značajno manja u odnosu na nepreživare. Niska potentnost i toksičnost, posebno kod mladih životinja ograničava mogućnost upotrebe metamizola i čini ga neprikladnim za indukciju hipotireoze kod preživara u eksperimentalne svrhe (Ibrahim i sar., 1984; Symonds i sar., 1996; Villar i sar., 2002), te je prema literaturnim navodima supstanca izbora za indukciju hipotireoze kod preživara PTU.

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji bio je ispitivanje metaboličkog i endokrinog statusa teladi, kod kojih je hipotireoidno stanje indukovano davanjem PTU majkama tokom završne faze graviditeta.

Radi postizanja postavljenog cilja, izvedeni su sledeći istraživački zadaci:

- Odabrana su novorođena telad poreklom od majki koje su tokom završne faze graviditeta tretirane sa PTU (ogledna grupa) i novorođena telad poreklom od majki koje nisu tretirane sa PTU (kontrolna grupa);
- sva telad su individualno napajana kolostrumom i mlekom tokom celog perioda ispitivanja i praćena je njihova telesna masa;
- Uzeti su uzorci tkiva placente krava majki i tkiva tireoidee teladi;
- Uzeti su uzorci krvi teladi, svakodnevno od dana rođenja do sedmog dana života;
- Određene su koncentracije TSH, T₄ i T₃ u svim uzetim uzorcima krvi;
- Određena je koncentracija IGF-I u uzorcima krvi uzetim 0., 1., 2., 3., 4. i 7. dana postnatalnog života;
- Određena su relativne zastupljenosti IGFBP-2 i IGFBP-3 u uzorcima krvi uzetim 0., 1., 2., 3., 4. i 7. dana postnatalnog života;
- Određene su koncentracije glukoze, insulina i kortizola u uzorcima krvi uzetim 0., 1., 2., 3., 4. i 7. dana postnatalnog života;
- Određene su koncentracije odabranih biohemijskih parametara (ukupni proteini, albumini, globulini, trigliceridi i holesterol) u uzorcima krvi uzetim od dana rođenja do sedmog dana postnatalnog života;
- Određene su ekspresije iRNK za pojedine tipove dejodinaza u uzorcima tkiva placente;
- Izvršena je histološka analiza uzoraka tkiva tireoidee ogledne i kontrolne grupe teladi

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Ogledne životinje

Eksperimentalni deo rada izveden je na ukupno dvadeset teladi (10 ženskih i 10 muških), holštajn-frizijske rase, oteljenih i uzgajanih na farmi komercijalnog tipa. Prosečna telesna masa teladi na rođenju bila je $38,5 \pm 3,2$ kg, a razlike u telesnoj masi između muških i ženskih jedinki nisu bile statistički značajna. Sva telad uključena u ogled oteljena su tokom oktobra 2012. godine, kada je prosečna dnevna temperatura u porodilištu i objektu za smeštaj novorođenih teladi iznosila 10-20°C. Nakon teljenja, novorođena telad su provela najviše dva sata uz svoje majke i bilo im je onemogućeno sisanje. Zatim su transportovana u susedni objekat, gde su, nakon merenja telesne mase, smeštana u individualne boksove u kojima su držana do kraja perioda ispitivanja. Tokom ispitivanog perioda telad nisu pokazivala znake poremećenog zdravlja i svo vreme su bila pod nadzorom veterinarske službe farme.

Po rođenju, telad su svrstana u grupe, u zavisnosti od toga da li su bila poreklom od majki koje su tokom graviditeta primale propiltiouracil ili ne. Prva grupa teladi (ogledna grupa, n = 10) poticala je od junica koje su počevši od 20. dana pre očekivanog termina teljenja do dana teljenja svakodnevno dobijale PTU (Sigma-Aldrich Chemical Company, Nemačka) u dozi od 4 mg/kg telesne mase. PTU je davan specijalnom špatulom za peroralno davanje lekova, pomešan sa 25ml maltoznog sirupa (Maltozni sirup 40, A.D. Industrija skroba „Jabuka“, Pančevo, Srbija). Davanje maltoznog sirupa i PTU vršeno je uvek u istom periodu dana, 4 sata nakon davanja jutarnjeg obroka. Druga grupa teladi (kontrolna grupa, n = 10) poticala je od junica koje su od 20. dana pre očekivanog termina teljenja do dana teljenja svakodnevno peroralno primale po 25 ml maltoznog sirupa. Davanje maltoznog sirupa vršeno je svakodnevno, u isto vreme kao kod junica koje su bile majke ogledne grupe teladi. Realizaciju istraživanja je odobrio Etički komitet Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, u skladu sa odredbama Zakona o dobrobiti životinja Republike Srbije (Službeni glasnik Republike Srbije 41/09).

Napajanje teladi vršeno je kolostrumom i mlekom njihovih majki tokom prvih sedam dana nakon teljenja. Prvo napajanje kolostrumom u količini od 1,5 litar izvršeno

je 2 sata nakon teljenja a zatim količinama od 2 litra u sledeća dva napajanja 12 i 24 sata posle, odnosno 14. i 26. sata ekstrauterinog života teladi. Nakon toga, telad su napajana u razmacima od po 12 sati, pri čemu su, u pogledu količine mleko, unosila po volji.

4.2. Uzimanje uzoraka biološkog materijala

4.2.1. Uzimanje uzoraka krvi

Uzorci krvi su uzimani punkcijom *v. jugularis* neposredno nakon teljenja (pre unosa kolostruma), a zatim svakodnevno tokom prvih sedam dana neonatalnog života. Uzorci krvi su uzimani u sterilne vakutajnere (serumske epruvete) bez antikoagulansa. Nakon spontane koagulacije na sobnoj temperaturi u periodu od 30 minuta, serum je izdvajan centrifugiranjem na 3000 obrtaja tokom 10 minuta. Dobijeni krvni serum je skladišten na temperaturi od -20°C, sve do izvođenja analiza.

4.2.2. Uzimanje uzoraka placentе

Uzorci tkiva placentе uzimani su neposredno nakon porođaja. Nakon uzimanja, uzorci tkiva placentе su oprani sa TBS (Tris Buffered Saline) rastvorom, temperiranim na 4°C, kako bi se uklonila krv i druge strane supstance. Potom su odvojeni maternalni (karunkuli) i fetalni (kotiledoni) deo placentе, te vezivno tkivo, da bi se dobili mali uzorci tkiva placentе, mase 5 grama koji su odmah zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C do izvođenja analiza.

4.2.3. Uzimanje uzoraka tkiva tireoidee

U periodu od sedmog do desetog dana života teladi izvršeno je uzorkovanje tkiva tireoidee uginule teladi, u cilju histološke analize tkiva tireoidee i određivanja ekspresije iRNK za pojedine tipove dejodinaza. Uzorci namenjeni za određivanje ekspresije iRNK za pojedine tipove dejodinaza zamrzavani su odmah nakon uzimanja u tečnom azotu, a potom čuvani na -80°C do izvođenja analiza. Uzorci namenjeni za histološku analizu tkiva tireoidee konzervisani su u 10% puferezovanom rastvoru formalina i tako čuvani do analize.

4.3. Analize uzoraka biološkog materijala

4.3.1. Analize uzoraka krvi

5.3.1.1. Određivanje koncentracije hormona

Koncentracije tireoidnih hormona i TSH, određivane su u uzorcima krvi uzetim 0.,1.,2.,3.,4.,5.,6. i 7. dana postnatalnog života teladi, dok su koncentracije insulina, kortizola i IGF-I određivane u uzorcima krvi uzetim 0.,1.,2.,3.,4., i 7. dana postnatalnog života teladi.

Koncentracije tireoidnih hormona, insulin, kortizola i IGF-I određivane su upotrebom komercijalnih RIA kitova (INEP, Zemun), prilagođenih za detekciju koncentracije hormona u krvnom serumu goveda, prema metodi koju su opisali Nikolić i saradnici (1996).

Koncentracija TSH određivana je upotrebom kvantitativne imunoenzimske metode ELISA uz upotrebu (Endocrine, USA).

5.3.1.2. Određivanje relativne zastupljenosti IGF-vezujućih proteina

Relativna zastupljenost IGF-vezujućih proteina (IGFBP-2 i IGFBP -3) određena je elektroforetskim razdvajanjem proteina i imunoblot metodom u odabranim uzorcima krvnih seruma uzetim 0., 1.,2.,3.,4., i 7. dana života teladi.

Priprema za određivanje relativne zastupljenosti IGF-vezujućih proteina, koja se sastoji od frakcionisanja proteina seruma teladi, rađena je metodom elektroforeze na SDS-PAGE 12,5% gelu, prema metodi koje su opisali Hossenlopp i sar. (1986) i Nikolić i sar. (1998). Uzorci seruma su potom razređeni u 0,05 PBS puferu (pH 7,4) u odnosu 1:25 za određivanje IGFBP-2 i odnosu 1:50 za određivanje IGFBP-3, a zatim sa puferom za uzorke koji u svom sastavu sadrži Tris-HCl pufer (pH=6,8), 2% SDS i 10% glicerol, u volumenskom odnosu 1:1. Nakon razređivanja, uzorci su zagrevani u vodenom kupatilu na 56°C u periodu od 7 minuta uz konstantno mešanje, kako bi se vezujući proteini izdvojili iz kompleksa sa molekulima IGF. Pripremljeni uzorci, u količini od 33μl, preneseni su na SDS-PAGE 12% gel za IGFBP 2 i 10% gel za IGFBP 3. Paralelno su korišćeni i biomarkeri (Bio-rad Laboratories). Elektroforeza je sprovedena uz pomoć aparata Mini-PROTEAN 3Cell (Bio-Rad Laboratories) sa konstantnim naponom od 150V u trajanju od 90 minuta.

Nakon elektroforeze, izdvojeni proteini krvnog seruma preneti su elektrotransferom na nitrocelulozne membrane (Whatman Protran, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, USA) na konstantni napon od 25V u periodu od 1 sat, koristeći Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) i pufer za transfer (0,025 M Tris-HCl, 0,19 M glycine, pH 8,3, 20% (v/v) methanol). Za potvrdu uspešnog transfera proteina membrane pristupilo se reverzibilnom bojenju membrana uz potapanje u 5% Ponceau S rastvor u periodu od 1 minuta. Nakon utvrđivanja uspešnog transfera, na membranama su obeležavane pozicije biomarkera i serumskih albumina. Nespecifično vezivanje za slobodna mesta na membrani je blokirano sa TBST puferom, koji sadrži 0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20; pH 7,4 uz dodatak 5% obezmašćenog mleka u prahu u periodu od jedan sat na sobnoj temperaturi. Membrane su inkubirane na 4°C tokom noći u TBST puferu, koji sadrži i dodatak 1% obezmašćenog mleka u prahu i rastvor primarnih antitela u odnosu 1:1000 (poliklonska antitela koze anti-IGFBP-2 (sc-6002), anti-IGFBP-3 (sc-6004) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. –Santa Cruz, CA, USA). Nakon ispiranja, membrane su inkubirane sa HSP (horseradish peroxidase) konjugovanim sekundarnim antitelima (anti-goat (SAG) IgG; Biosource, Camarillo, USA) i TBST puferom u odnosu 1:10000 na sobnoj temperaturi u periodu od jedan sat, kako bi se detektovala primarna antitela koja su se vezala na membrane.

Vizuelizacija IGF vezujućih proteina omogućena je metodom autoradiografije, koristeći napredan hemiluminiscentan kit koji sadrži luminol kao supstrat (Amersham, Little Chalfont, UK). Korišteni su KODAK (Paris, France) rentgen filmovi i reagensi za razvoj rentgen filmova. Nakon razvijanja i fiksacije, film je osušen na vazduhu. Tako pripremljeni rentgen filmovi su skenirani i analizirani, pri čemu je intenzitet zatamnjenja određivan denzitometrijskom metodom, koristeći Image Master Total Lab software, verzija 2.0 (Amersham, UK). Relativan intenzitet zatamnjenja traka na položajima očekivanim za IGFBP prikazan je u ADU (Arbitrary Densitometric Units).

5.3.1.3. Određivanje koncentracije odabranih biohemijskih parametara krvi

Koncentracije ukupnih proteina, globulina, albumina, triglicerida i holesterola u krvi određivane su u svim uzetim uzorcima krvi, spektrofotometrijskom metodom na biohemijskom analizatoru Chemm Well, Awareness Technology, upotrebom test paketa Giese Diagnostics. Koncentracija glukoze u serumu određivane su 1.,2.,3.,4.,i 7 dan

postnatalnog života na aparatu Precision Xceed (Abbott, SAD) upotrebom komercijalno dostupnih traka istog proizvođača.

4.3.2. Analiza uzoraka tkiva

5.3.2.1. Određivanje ekspresije iRNK za pojedine tipove dejodinaza u tkivu placente i tireoidee.

Za određivanje ekspresije iRNK za pojedine tipove dejodinaza u uzorcima tkiva placente i tireoidee korišćen je metod PCR nakon ekstrakcije RNK i reverzne transkripcije.

Ukupna količina RNK izolovana je Trizol[®] reagensom (Invitrogen, Life Technologies, SAD). Tkivo je homogenizovano u Potter-Elvehjem staklo-teflonskom homogenizatoru sa Trizol[®] reagensom u odnosu 1 ml reagens na 100 mg tkiva. Dobijeni homogenati su inkubirani 5 minuta na 30°C da bi nukleoproteinski kompleksi potpuno disosovali. U svaki homogenat je dodavano 0,2 hloroforma nakon čega je sledilo intenzivno mešanje u trajanju od 15 sekundi. Zatim su homogenati inkubirani 3 minuta na 30°C, a potom centrifugirani 15 minuta na 12,000g na temperaturi od 4°C. Nakon centrifugiranja izdvojena je vodena faza u koja se nalazio RNK i pomešao se sa 0,5 ml izopropanola. Nakon toga je usledila inkubacija smeše u periodu od 10 minuta na 30°C a onda centrifugiranje na 12,000g 10 minuta na 4°C. Nakon centrifugiranja talog se resuspendovao u jednoj zapremini 75% etanola i centrifugirao na 7500g, 5 minuta na 4°C. Dobijeni talog je osušen na vazduhu i rastvoren u 100µl 0,1% DEPC vode.

Za sinteza cDNK iz RNK korišćen je reverzni transkripcioni kit (Applied Biosystems, Life Technologies, SAD). Od ukune količine RNK, 2µl inkubirano je sa reverznom transkriptazom MultiScribe (50 U/ µl), u prisustvu 2 µl Random Prajmera, 0,8 µl 100 mM dNTP Mix, 1 µl RN-aza inhibitora i 10xRT pufera u ukupnoj količini od 20 µl. Dobijene cDNK su potom čuvane na -20°C.

Specifični prajmeri, prikazani u Tabeli 4.1., kreirani su da selektivno umnože iRNK za DIO1, DIO2, DIO3 i ATP5B, subjedinicu mitohondrijalne ATP sintetaze, korištene kao ciljni gen. Za svaki set prajmera sprovedeni su kontrolni eksperimenti, kako bi se definisao linearni raspon za PCR umnožavanje. Kao dodatne kontrole, za svaku reakciju su sprovedene i slepe PCR probe, bez uzoraka.

Tabela 4.1. Lista prajmera upotrebljenih u PCR reakciji

Ime	Orijentacija	Prajmer sekvenca	Veličina (bp)	Reference
DIO1	For	5'-ggt tcc gta gca gat ttt ctc atc-3'	273	Myers i saradnici, 2008
	Rev	5'-gtt cca agg acc agg ttt acc c-3'		
DIO2	For	5'-cca cct tct gga ctt tgc ca-3'	134	Capuco i saradnici, 2008
	Rev	5'-gga agt cag cca cgg atg ag-3'		
DIO3	For	5'-tca ctc cct gag gct ctg-3'	120	Capuco i saradnici, 2008
	Rev	5'-ccc agt aaa tgc tta cgg atg-3'		
ATP5B	For	5'-cat cgt ggc ggt cat tgg-3'	148	Do Amaral i saradnici, 2010
	Rev	5'-aat ggt cct tac tgt gct ctc-3'		

Za izvođenje reakcije, odgovarajuća razređenja uzoraka cDNK su pomešana sa PCR puferom koji je sadržao 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0,25 μM prajmera za DIO1, DIO2, DIO3 i ATP5B, 2 jedinice Taq polimeraze u ukupnoj zapremini od 25 μl. cDNK su umnožene u Eppendorf Mastercycler u 28 ciklusa u sledećim uslovima: denaturacija 94°C/45 s; hlađenje 55°C/1 min (DIO1, DIO2), 61°C/1 min (DIO3) odnosno 58°C/1 min (ATP5B); ekstenzija 72°C/1 min; finalna ekstenzija 72°C/8 min. PCR proizvodi su potom podvrgnuti elektroforezi na 2% agarozu gelu zajedno sa MassRuler Low Range DNA Ladder, 50-1500 bp (Fermentas, SAD), i vizualizovani pod UV svetlosti uz pomoć etidijum bromida. Intenzitet PCR proizvoda meren je fluorescentnom digitizacijom uz pomoć aparata GelDoc 1000 (BioRad, Hercules, CA). Kvantifikacija RT-PCR produkata izvršena je denzitometrijski, uz pomoć ImageJ softvera (National Institutes of Health, SAD), a intenzitet dobijenih traka je izražen u arbitrarnim jedinicama (Arbitrary Unit, AU). Arbitrarne jedinice za produkte amplifikacije DIO1, DIO2 i DIO3 su podeljene prema produktu amplifikacije gena ATP5B upotrebljenog u istoj PCR reakciji. Za svaki gen su urađene najmanje tri nezavisne analize.

5.3.2.2. Histološka analiza tkiva tireoidee

Deo isečka tkiva tireoidee za histološke analize fiksiran je u 10% neutralnom puferizovanom rastvoru formalina. Nakon toga tkivo je tretirano u automatskom tkivnom procesoru (Leica, Nemačka) pri čemu je izvršena dehidracija i impregnacija tkiva u parafinu. Nakon kalupenja u parafinu, tkivo je uz pomoć mikrotoma isečeno na listiće debljine 5 μ m. Histološki preparati obojeni su sa hematoksilin-eozinom i specijalnim histološkim bojenjem, koristeći Masson-Goldener's trichrome tehniku.

4.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvršena je uz pomoć softverskog paketa STATISTICA 6 (StatSoft, SAD). Rezultati istraživanja prikazani su uz pomoć parametara deskriptivne statistike. Statistička značajnost razlika vrednosti ispitivanih parametara (p) između ogledne i kontrolne grupe teladi testirana je uz pomoć Studentovog "t" testa. Kao statistički značajne uzete su razlike na nivou od $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Rezultati istraživanja prikazani su odvojeno za svaki ispitivani parametar.

5.1. Koncentracija trijodtironina (T₃) u krvnom serumu teladi

Koncentracija T₃ u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika u koncentracijama između kontrolne i ogledne grupe prikazane su u tabeli 5.1.1.

Tabela 5.1.1. Koncentracija T₃ (mmol/L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe izražena kao $\bar{X} \pm SE$, uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan neonatalnog života	Koncentracija T ₃ (mmol/L)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	6,04 ± 0,41	2,31 ± 0,22	p < 0,001
1	4,73 ± 0,48	2,82 ± 0,19	p < 0,01
2	4,29 ± 0,39	3,45 ± 0,29	NZ
3	3,97 ± 0,32	4,23 ± 0,29	NZ
4	3,62 ± 0,23	9,68 ± 0,91	p < 0,001
5	2,79 ± 0,20	7,26 ± 0,42	p < 0,001
6	2,80 ± 0,24	7,50 ± 0,76	p < 0,001
7	2,39 ± 0,23	3,34 ± 0,25	p < 0,05

NZ – razlika nije statistički značajna

Podaci prikazani u tabeli 5.1.1. ukazuju da je koncentracija T₃ u krvnom serumu teladi kontrolne grupe bila statistički značajno viša nego kod ogledne grupe na dan teljenja i prvog dana neonatalnog života, a statistički značajno niža u periodu od četvrtog do sedmog dana neonatalnog života. Drugog i trećeg dana neonatalnog života nije bilo značajne razlike u koncentraciji T₃ između dve ispitivane grupe teladi, iako su se apsolutne vrednosti numerički razlikovale.

U tabeli 5.1.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija T₃ utvrđenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 6.1.2. Statistička značajnost razlika (p) između koncentracija T₃ ustanovljenih unutar kontrolne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0							
1	NZ	1						
2	**	NZ	2					
3	***	NZ	NZ	3				
4	***	*	NZ	NZ	4			
5	***	**	**	**	*	5		
6	***	**	**	**	*	NZ	6	
7	***	***	***	***	**	NZ	NZ	

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0.05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Vrednosti koncentracija T₃ kod kontrolne grupe teladi su se postepeno snižavale počevši od dana teljenja do sedmog dana neonatalnog života. Pri tome su vrednosti ustanovljene na dan teljenja bile statistički značajno više u odnosu na sve ostale vrednosti tokom ispitivanog perioda. Postepenost opadanja koncentracije T₃ tokom ispitivanog perioda se vidi i iz izostanka statističke značajnosti razlika u koncentracijama tokom uzastopnih dana ispitivanja, sa izuzetkom razlike između četvrtog i petog dana postnatalnog života teladi, koja je bila statistički značajna.

U tabeli 5.1.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija T₃ ustanovljenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.1.3. Statistička značajnost razlika između koncentracija T₃ ustanovljenih unutar ogleadne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0						
1	NZ	1					
2	**	NZ	2				
3	***	***	NZ	3			
4	***	***	***	***	4		
5	***	***	***	***	*	5	
6	***	***	***	***	NZ	NZ	6
7	**	NZ	NZ	*	***	***	***

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Vrednosti koncentracija T₃ kod ogleadne grupe teladi su se postepeno povećale počevši od nultog dana do trećeg dana. Koncentracija određena nultog dana bila je statistički značajno niža u odnosu na vrednosti dobijene u ostalim danima ispitivanja, izuzev vrednosti određene prvog dana postnatalnog života. Koncentracije T₃ su četvrtog dana dostigle najviši nivo, i bile su statistički značajno više u odnosu na vrednosti koncentracija određenih svih ostalih dana ispitivanog perioda izuzev šetog dana postnatalnog života. Nakon šestog dana koncentracija je značajno opala do vrednosti koja se statistički nije razlikovala od vrednosti dobijenih prvog i drugog dana neonatalnog života.

5.2. Koncentracija tiroksina (T₄) u krvnom serumu teladi

Koncentracija T₄ u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika u koncentracijama između kontrolne i ogledne grupe prikazane su u tabeli 5.1.2.

Tabela 5.2.1. Koncentracija T₄ (mmol/L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe izražena kao $\bar{X} \pm SE$, uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan neonatalnog života	Koncentracija T ₄ (mmol/L)		Značajnost razlika (p) između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	280,82 ± 17,47	105,67 ± 9,71	p < 0,001
1	265,61 ± 17,58	119,95 ± 11,15	p < 0,001
2	237,74 ± 10,06	163,26 ± 15,49	p < 0,001
3	222,32 ± 8,68	233,81 ± 16,27	NZ
4	180,88 ± 8,89	259,94 ± 18,14	p < 0,01
5	139,74 ± 10,34	250,42 ± 18,74	p < 0,001
6	119,79 ± 4,67	244,63 ± 21,42	p < 0,001
7	107,95 ± 1,75	133,17 ± 12,74	p = 0,06

NZ – razlika nije statistički značajna

Podaci prikazani u tabeli 5.2.1. ukazuju da je koncentracija T₄ u krvnom serumu teladi kontrolne grupe u odnosu na oglednu grupu bila statistički značajno viša tokom prva dva dana postnatalnog života, a statistički značajno niža u periodu od četvrtog do sedmog dana neonatalnog života. Trećeg dana neonatalnog života nije bilo značajne razlike u koncentraciji T₄ između dve ispitivane grupe teladi.

U tabeli 5.2.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija T₄ utvrđenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.2.2. Statistička značajnost razlika između koncentracija T₄ ustanovljenih unutar kontrolne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0						
1	NZ	1					
2	*	NZ	2				
3	**	*	NZ	3			
4	***	***	***	**	4		
5	***	***	***	***	**	5	
6	***	***	***	***	***	NZ	6
7	***	***	***	***	***	**	*

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Vrednosti koncentracija T₄ kod kontrolne grupe teladi su se snižavale počevši od dana rađanja pa do sedmog dana neonatalnog života. Vrednosti ustanovljene na nulti dan bile su statistički značajno više u odnosu na sve ostale vrednosti tokom ispitivanog perioda, sa izuzetkom prvog dana nakon teljenja. Trend opadanja koncentracije T₄ tokom prva dva dana neonatalnog života teladi bio je postepen, što se vidi i iz ostanka statističke značajnosti razlika, da bi od trećeg dana života do kraja ispitivanog perioda postojale statistički značajne razlike (sa izuzetkom razlike između petog i šestog dana neonatalnog života teladi).

U tabeli 5.2.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija T₄ utvrđenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.2.3. Statistička značajnost razlika između koncentracija T₄ ustanovljenih unutar ogleadne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0						
1	NZ	1					
2	**	*	2				
3	***	***	**	3			
4	***	***	***	NZ	4		
5	***	***	**	NZ	NZ	5	
6	***	***	**	NZ	NZ	NZ	6
7	NZ	NZ	NZ	***	***	***	***

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Vrednosti koncentracije T₄ unutar ogleadne grupe teladi su se povećavale do četvrtog dana kada su dosegle najviši nivo unutar ispitivanog perioda. U periodu od trećeg do šestog dana održavana je visoka koncentracija uz izostanak statističke značajnosti razlika u vrednostima dobijenim tokom ovog perioda. U odnosu na nulti dan, vrednosti koncentracije T₄ bile su statistički značajno više u svim periodima ispitivanja, sve do šestog dana neonatalnog života. Vrednosti su sedmog dana značajno smanjene u odnosu na šesti dan ispitivanja i dobijena vrednost se nije statistički značajno razlikovala u odnosu na nulti, prvi i drugi dan neonatalnog života.

5.3. Koncentracija tireostimulirajućeg hormona (TSH) u krvnom serumu teladi

Koncentracija TSH u krvnom serumu teladi kontrolne i ogleadne grupe, kao i statistička značajnost razlika u koncentracijama između kontrolne i ogleadne grupe prikazane su u tabeli 5.3.1.

Tabela 5.3.1. Koncentracija TSH (mmol/L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogleadne grupe izražena kao $\bar{X} \pm SE$, uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan neonatalnog života	Koncentracija TSH (mmol/L)		Značajnost razlika (p) između kontrolne i ogleadne grupe
	Kontrolna grupa	Ogleadna grupa	
0	1,46 ± 0,25	15,23 ± 0,99	p < 0,001
1	2,49 ± 0,53	13,35 ± 0,84	p < 0,001
2	3,68 ± 0,35	8,30 ± 1,44	p < 0,01
3	1,79 ± 0,44	8,51 ± 0,55	p < 0,001
4	2,75 ± 0,64	3,63 ± 0,79	NZ
5	2,65 ± 0,24	1,79 ± 0,23	p < 0,05
6	2,64 ± 0,29	1,63 ± 0,15	p < 0,01
7	1,91 ± 0,22	1,51 ± 0,16	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Podaci prikazani u tabeli 5.3.1. ukazuju da je koncentracija TSH u krvnom serumu teladi kontrolne grupe bila statistički značajno niža u odnosu na ogleadnu grupu na dan rađanja i tokom prvih tri dana, dok je bila statistički značajno viša petog i šestog dana neonatalnog života. Nije bilo značajne razlike između grupa u vrednosti koncentracija TSH četvrtog i sedmog dana postnatalnog života i pored toga što su se apsolutne vrednosti uočljivo numerički razlikovale.

U tabeli 5.3.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija TSH utvrđenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.3.2. Statistička značajnost razlika između koncentracija TSH ustanovljenih unutar kontrolne grupe

Dan neonatalnog života	0						
1	NZ	1					
2	***	NZ	2				
3	NZ	NZ	**	3			
4	NZ	NZ	NZ	NZ	4		
5	**	NZ	*	NZ	NZ	5	
6	**	NZ	*	NZ	NZ	NZ	6
7	NZ	NZ	***	NZ	NZ	*	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0.05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Na dan rađanja kod teladi kontrolne grupe ustanovljene su najniža vrednosti koncentracije TSH u serumu. Postepeno povećanje ustanovljeno je počevši od nultog do drugog dana neonatalnog života, kada je ustanovljena najviša vrednost tokom ispitivanog perioda, koja je bila značajno viša u odnosu na sve ostale vrednosti određene tokom ispitivanog perioda. Trećeg dana ustanovljen je statistički značajan pad koncentracije TSH u odnosu na drugi dan. Nakon neznačajnog rasta koncentracija četvrtog dana u odnosu na treći dan ispitivanja, vrednosti koncentracije TSH u krvi teladi kontrolne grupe su postepeno opadale prema kraju ispitivanog perioda s tim da razlike između uzastopnih merenja nisu bile statistički značajne.

U tabeli 5.3.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija TSH utvrđenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.3.3. Statistička značajnost razlika između koncentracija TSH ustanovljenih unutar ogledne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0						
1	NZ	1					
2	**	**	2				
3	***	***	NZ	3			
4	***	***	**	***	4		
5	***	***	***	***	*	5	
6	***	***	***	***	*	NZ	6
7	***	***	***	***	*	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Vrednosti koncentracija TSH u krvi ogledne grupe teladi imale su trend postepenog i konstantnog opadanja počevši od dana rađanja prema kraju ispitivanog perioda, koji je bio i statistički značajan sve do petog dana neonatalnog života, kada se koncentracija TSH stabilizovala. Stabilizacija koncentracije TSH vidi se iz izostanka statističke značajnosti razlike između vrednosti ustanovljenih u periodu od petog do sedmog dana neonatalnog života. Iz tabele se može videti da je u prvih pet dana nakon telenja, trend opadanja koncentracije TSH postepen jedino u periodu do prvi dan nakon rađanja i periodu od drugog do trećeg dana, na šta ukazuje i izostanak značajnost razlika između ustanovljenih vrednosti za te periode.

5.4. Koncentracija insulina u krvnom serumu teladi

Koncentracija insulina u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika u koncentracijama između kontrolne i ogledne grupe prikazane su u tabeli 5.4.1.

Tabela 5.4.1 Koncentracija insulina ($\mu\text{IU/L}$) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe izražena kao $\bar{X} \pm \text{SE}$, uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan neonatalnog života	Koncentracija insulina ($\mu\text{IU/L}$)		Značajnost razlika (p) između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	28,30 \pm 2,59	14,93 \pm 0,78	p < 0,001
1	25,40 \pm 2,39	15,26 \pm 0,76	p < 0,001
2	24,10 \pm 1,79	18,74 \pm 1,59	p < 0,05
3	21,32 \pm 1,49	18,25 \pm 1,02	NZ
4	19,52 \pm 1,51	21,71 \pm 2,01	NZ
7	17,76 \pm 1,39	15,70 \pm 1,08	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz tabele 5.4.1. se zapaža da je koncentracija insulina u krvnom serumu kontrolne grupe bila statistički značajno viša poređenjem sa vrednostima koncentracija ogledne grupe na dan rađanja i tokom prva dva dana neonatalnog života. Počevši od trećeg dana do kraja ispitivanog perioda, nije ustanovljena statistički značajna razlika u vrednosti koncentracija insulina između kontrolne i ogledne grupe.

U tabeli 5.4.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija insulina utvrđenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.4.2. Statistička značajnost razlika između koncentracija insulina unutar kontrolne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0				
1	NZ	1			
2	NZ	NZ	2		
3	*	NZ	NZ	3	
4	**	NZ	NZ	NZ	4
7	**	*	*	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Koncentracija insulina u krvi kontrolne grupe teladi se postepeno snižavala počevši od nultog dana do kraja ispitivanog perioda uz izostanak statističke značajnosti razlike između vrednosti određenih u uzastopnim merenjima. U odnosu na dan teljenja, statistički značajno niža koncentracija insulina ustanovljena je trećeg, četvrtog i sedmog dana postnatalnog života.

U tabeli 5.4.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija insulina ustanovljenih unutar ogleadne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.4.3. Statistička značajnost razlika između koncentracija insulina unutar ogleadne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0				
1	NZ	1			
2	*	NZ	2		
3	*	*	NZ	3	
4	**	**	NZ	NZ	4
7	NZ	NZ	NZ	NZ	*

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Koncentracija insulina u krvi ogleadne grupe teladi postepeno se povećavala u periodu od rođenja do četvrtog dana neonatalnog života, kada je ustanovljena najviša vrednost koncentracije insulina unutar ispitivanog perioda. Između vrednosti

kocentracija utvrđenih u uzastopnim merenjima do četvrtog dana neonatalnog života nisu ustanovljene statistički značajne razlike. Statistički značajno povećanje vrednosti u odnosu na nulti dan ustanovljeno je drugog, trećeg i četvrtog dan neonatalnog života, a u odnosu na prvi dan je ustanovljeno trećeg i četvrtog dana neonatalnog života. Sedmog dana ustanovljen je pad koncentracija insulina pri čemu su se vrednosti statistički značajno razlikovale u odnosu na vrednosti određene četvrtog dana, ali ne i na vrednosti određene ostalih dana ispitivanja.

5.5. Koncentracija glukoze u krvi teladi

Koncentracija glukoze u krvi teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika u koncentracijama između kontrolne i ogledne grupe prikazane su u tabeli 5.5.1.

Tabela 5.5.1 Koncentracija glukoze (mmol/L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe izražena kao $\bar{X} \pm SE$, uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan neonatalnog života	Koncentracija glukoze (mmol/L)		Značajnost razlika (p) između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	3,76 ± 0,33	2,42 ± 0,22	p < 0,01
1	4,49 ± 0,30	2,92 ± 0,14	p < 0,001
2	5,54 ± 0,42	3,35 ± 0,13	p < 0,001
3	5,52 ± 0,44	4,12 ± 0,15	p < 0,01
4	5,57 ± 0,42	4,57 ± 0,24	NZ
7	4,73 ± 0,10	4,39 ± 0,14	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz tabele 5.5.1. zapaža se da koncentracija glukoze u krvnom serumu ogledne grupe je bila niža u odnosu na vrednosti koncentracija kontrolne grupe tokom čitavog perioda ispitivanja. Vrednosti koncentracije glukoze između grupe u prvih tri dana statistički značajno su se razlikovale dok u periodu od četvrtog do sedmog dana nije ustanovljena statistički značajna razlika.

U tabeli 5.5.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija insulina utvrđenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe teladi.

Tabela 5.5.2. Statistička značajnost razlika između koncentracija glukoze unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja

Dan neonatalnog života	0					
1	NZ	1				
2	**	NZ	2			
3	**	NZ	NZ	3		
4	**	NZ	NZ	NZ	4	
7	*	NZ	NZ	NZ	NZ	

NZ – razlika nije statistički značajna * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$;

Koncentracija glukoze u krvnom serumu teladi kontrolne grupe imala je trend postepenog rasta od dana teljenja do četvrtog dana nakon rođenja, pri čemu razlike između vrednosti dobijenih u uzastopnim merenjima nisu bile statistički značajne. Nakon četvrtog dana, do sedmog dana, ustanovljen je blagi neznačajan pad koncentracije glukoze. Statistički značajne razlike za vrednosti koncentracije glukoze u krvi kontrolne grupe teladi u odnosu na dan teljenja, ustanovljene su za sve dane ispitivanja (sa izuzetkom prvog dana nakon teljenja), dok je značajnost razlika između ostalih ustanovljenih vrednosti izostala ili je bila na granici značajnosti.

U tabeli 5.5.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija glukoze ustanovljenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.5.3. Statistička značajnost razlika između koncentracija glukoze unutar ogledne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0				
1	NZ	1			
2	**	*	2		
3	***	***	**	3	
4	***	***	***	NZ	4
7	***	***	***	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$;

Iz tabele 5.5.3. zapaža se značajan rast koncentracije glukoze u serumu teladi ogledne grupe počevši od dana rađanja pa sve do četvrtog dan života, s tim da su vrednosti koncentracije glukoze ustanovljene na dan teljenja bile statistički značajno niže u odnosu na sve kasnije ustanovljene vrednosti, izuzev vrednosti koncentracije ustanovljene prvog dana neonatalnog života. Takođe se zapaža da je porast koncentracije glukoze postepen, odnosno statistički nije značajan, u periodu od trećeg do četvrtog dana života. Nakon četvrtog dana, koncentracije glukoze postepeno opadaju ali se nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na vrednosti utvrđene četvrtog dana.

5.6. Koncentracija kortizola u krvnom serumu teladi

Koncentracije kortizola u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe prikazane su u tabeli 5.6.1

Tabela 5.6.1 Koncentracija kortizola (nmol/L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe izražena kao $\bar{X} \pm SE$, uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan neonatalnog života	Koncentracija kortizola (nmol/l)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	139,89 ±13.43	308,60 ± 27.85	p < 0,001
1	116,02 ±10.91	264,07 ± 23.79	p < 0,001
2	95,89 ±7.76	202,94 ± 17.51	p < 0,001
3	67,30 ±6.79	177,99 ± 16.92	p < 0,001
4	64,02 ±6.76	142,13 ± 14.02	p < 0,001
7	49,90 ±4.91	79,45 ± 6.59	p < 0,01

Podaci prikazani u tabeli 5.6.1. ukazuju da su koncentracije kortizola u krvnom serumu ogledne grupe teladi tokom čitavog perioda ispitivanja bile statistički značajno veće u odnosu na vrednosti ustanovljene kod kontrolne grupe teladi.

U tabeli 5.6.2 prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija kortizola utvrđenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.6.2. Statistička značajnost razlika između koncentracija kortizola unutar kontrolne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0				
1	NZ	1			
2	*	NZ	2		
3	***	***	*	3	
4	***	***	**	NZ	4
7	***	***	***	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Koncentracija kortizola u krvi kontrolne grupe teladi se postepeno smanjivala počevši od dana rađanja prema kraju ispitivanog perioda s tim da je izostala značajnost razlike između uzastopnih merenja, izuzev između drugog i trećeg dana neonatalnog života. Vrednosti ustanovljene na dan rođenja bila su statistički značajno više u odnosu na kasnije ustanovljene vrednosti, izuzev u odnosu na prvi dan nakon rađanja. Najniža vrednost koncentracije kortizola kod teladi kontrolne grupe ustanovljena je sedmog dana kada se vrednost koncentracije statistički značajno razlikovala u odnosu na vrednosti određene tokom prva tri dana neonatalnog života, ali ne i u odnosu na vrednosti određene trećeg i četvrtog dana života.

U tabeli 5.6.3 prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija kortizola ustanovljenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.6.3. Statistička značajnost razlika između koncentracija kortizola unutar ogledne grupe teladi

Dan Neonatalnog života	0				
1	NZ	1			
2	**	NZ	2		
3	***	**	NZ	3	
4	***	***	*	NZ	4
7	***	***	***	***	***

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Koncentracija kortizola u serumu teladi ogledne grupe je opadala od dana rađanja do kraja ispitivanog perioda, pri čemu razlike između vrednosti ustanovljenih u uzastopnim danima nisu bile statistički značajne, sa izuzetkom razlike između četvrtog i sedmog dana života. Razlike između svih ostalih vrednosti ustanovljenih kod ogledne grupe su se značajno razlikovale. Najniže vrednosti kortizola ustanovljene su sedmog dana kada su koncentracije bile statistički značajno niže u odnosu na koncentracije u svim ostalim periodima ispitivanja.

5.7. Koncentracija IGF-I u krvnom serumu teladi

Koncentracija IGF-I u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika u koncentracijama između kontrolne i ogledne grupe prikazane su u tabeli 5.7.1.

Tabela 5.7.1. Koncentracija IGF-I (nmol/L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe izražena kao $\bar{X} \pm SE$, uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan neonatalnog života	Koncentracija IGF-I (nmol/L)		Značajnost razlika (p) između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	14,33 ± 1,16	8,48 ± 0,66	p < 0,001
1	18,62 ± 1,72	11,77 ± 1,05	p < 0,01
2	18,19 ± 1,59	13,07 ± 0,68	p < 0,01
3	18,29 ± 1,55	10,54 ± 0,99	p < 0,001
4	19,07 ± 1,49	11,98 ± 1,02	p < 0,001
7	16,65 ± 1,12	15,64 ± 1,14	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Podaci prikazani u tabeli 5.7.1. ukazuju da koncentracije IGF-I u krvnom serumu teladi ogledne grupe bile su statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu tokom čitavog perioda ispitivanja, izuzev sedmog dana nakon teljenja, kada je statistička značajnost razlika izostala, iako su numeričke vrednosti i dalje bile niže u oglednoj grupi teladi.

U tabeli 5.7.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija IGF-I utvrđenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.7.2. Statistička značajnost razlika između koncentracija IGF-I ustanovljenih unutar kontrolne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0				
1	NZ	1			
2	NZ	NZ	2		
3	NZ	NZ	NZ	3	
4	*	NZ	NZ	NZ	4
7	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0.05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Vrednosti koncentracija IGF-I u krvi kontrolne grupe teladi su se postepeno povećavale od dana teljenja do četvrtog dana neonatalnog života, s tim da nije ustanovljena statistička značajnost razlike vrednosti uzastopnih merenja. Koncentracije IGF-I na četvrti dan dostigle su najviše vrednosti tokom ispitivanog perioda i jedino u tom periodu merenja ustanovljena je statistički značajna razlika poređenjem sa vrednostima koncentracije IGF-I na dan rađanja.

U tabeli 5.7.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija IGF-I utvrđenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.7.3. Statistička značajnost razlika između koncentracija IGF-I ustanovljenih unutar ogledne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0				
1	**	1			
2	***	NZ	2		
3	NZ	NZ	NZ	3	
4	**	NZ	NZ	NZ	4
7	***	*	NZ	**	*

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Koncentracije IGF-I u serumu teladi ogledne grupe značajno je porasla do drugog dana, nakon čega je ustanovljen pad koncentracije do trećeg dana ispitivanog perioda, s tim da se vrednosti koncentracije IGF-I trećeg dana nisu statistički razlikovale poređenjem sa vrednostima određenim nultog dana. Koncentracije ustanovljene nultog dana bile su statistički značajno niže u odnosu na sve kasnije ustanovljene vrednosti, sa izuzetkom koncentracije trećeg dana života. Nakon trećeg dana koncentracije IGF-I rastu sve do sedmog dana kada su ustanovljene i najviše vrednosti koncentracije IGF-I. Vrednost ustanovljena sedmog dana bila je statistički značajno viša u odnosu na sve ranije ustanovljene vrednosti, sa izuzetkom vrednosti drugog dana života, kada je razlika bila na granici statističke značajnosti.

5.8. Relativna zastupljenost IGF-vezujućih proteina u krvnom serumu teladi

Relativna zastupljenost IGFBP-2 u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe prikazana je u tabelama 5.8.1., 5.8.2. i 5.8.3.

Tabela 5.8.1. Relativna zastupljenost IGFBP-2 (ADU/10 μ L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe izražena kao $\bar{X} \pm SE$, uz prikaz statističke značajnosti razlika

Dan neonatalnog života	Relativna zastupljenost IGFBP-2 (ADU/10 μ L)		Značajnost razlika (p) između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	280825,3 \pm 23927,4	183114,4 \pm 16504,1	p < 0,01
1	286092,3 \pm 17829,6	173547,5 \pm 18561,9	p < 0,001
2	310730,5 \pm 16662,9	183412,2 \pm 16779,4	p < 0,001
3	329914,5 \pm 21737,9	187914,2 \pm 17405,8	p < 0,001
4	376808,6 \pm 25070,6	212597,6 \pm 23063,61	p < 0,001
7	240195,6 \pm 21725,1	207850,1 \pm 20679,3	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Podaci prikazani u tabeli 5.8.1. ukazuju da je relativna zastupljenost IGFBP-2 u krvnom serumu teladi ogledne grupe bila statistički značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom tokom čitavog perioda ispitivanja, izuzev sedmog dana neonatalnog života, iako je i u tom periodu, apsolutna numerička vrednost bila niža u odnosu na kontrolne grupu teladi.

U tabeli 5.8.2. prikazana je statistička značajnost razlika između relativnih zastupljenosti IGFBP-2 utvrđenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.8.2. Statistička značajnost razlika između relativnih zastupljenosti IGFBP-2 ustanovljenih unutar kontrolne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0				
1	NZ	1			
2	NZ	NZ	2		
3	NZ	NZ	NZ	3	
4	*	**	*	NZ	4
7	NZ	NZ	*	**	***

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0.05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Relativna zastupljenost IGFBP-2 u krvi teladi kontrolne grupe je postepeno rasla sve do četvrtog dana nakon teljenja, kada je dostigla najvišu vrednost tokom ispitivanog perioda. Ta vrednost je bila statistički značajno viša u odnosu na vrednosti određene na dan rađanja i prvih dva dana života. Nakon četvrtog dana, relativna zastupljenost IGFBP-2 značajno opada, da bi sedmog dana dosegla najnižu vrednost tokom ispitivanog perioda. Vrednosti relativne zastupljenosti IGFBP-2 sedmog dana bile su statistički značajno niže poređenjem sa koncentracijama drugog, trećeg i četvrtog dana neonatalnog života.

U tabeli 5.8.3. prikazana je statistička značajnost razlika između relativne zastupljenosti IGFBP-2 utvrđenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.8.3. Statistička značajnost razlika između relativne zastupljenosti IGFBP-2 ustanovljenih unutar ogledne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0				
1	NZ	1			
2	NZ	NZ	2		
3	NZ	NZ	NZ	3	
4	NZ	NZ	NZ	NZ	4
7	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Relativna zastupljenost IGFBP-2 u krvi ogledne grupe teladi se postepeno povećavala od dana rađanja do kraja ispitivanog perioda, pri čemu nisu ustanovljene statistički značajne razlike u vrednosti između uzastopnih dana ispitivanja.

Relativna zastupljenost IGFBP-3 u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe prikazana je u tabelama 5.8.4., 5.8.5. i 5.8.6.

Tabela 5.8.4. Relativna zastupljenost IGFBP-3 ADU/10 μ L u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe izražena kao $\bar{X} \pm SE$ uz prikaz statističke značajnosti razlika

Starost teladi - dan	Zastupljenost IGFBP-3 ADU/10 μ L		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	739935,8 \pm 52142,02	381854 \pm 36599,75	p < 0,001
1	647940,1 \pm 42427,77	351673,5 \pm 27706,59	p < 0,001
2	605680,7 \pm 39572,62	322485,5 \pm 27914,40	p < 0,001
3	570433 \pm 36207,14	302095,7 \pm 28568,32	p < 0,001
4	556861,5 \pm 33637,49	295512,6 \pm 28387,76	p < 0,001
7	479927,5 \pm 43341,91	387109,8 \pm 32226,82	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz tabele 5.8.4. zapaža se da je relativna zastupljenost IGFBP-3 u serumu ogledne grupe teladi statistički značajno niža tokom prvih četiri dana ispitivanog perioda u odnosu na relativne zastupljenosti IGFBP-3 kod kontrolne grupe. Razlike vrednosti relativne zastupljenosti nisu bili statistički značajne jedio sedmog dana neonatalnog života i pored toga što je numerička vrednost bila manja kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu.

U tabeli 5.8.5. prikazana je statistička značajnost razlika između relativnih zastupljenosti IGFBP-3 utvrđenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.8.5. Statistička značajnost razlika između relativnih zastupljenosti IGFBP-3 ustanovljenih unutar kontrolne grupe teladi

Starost teladi	0	1	2	3	4
1	NZ				
2	NZ	NZ			
3	*	NZ	NZ		
4	**	NZ	NZ	NZ	
7	**	*	*	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0.05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Postepeni pad relativne zastupljenosti IGFBP-3 u ispitivanom periodu vidi se kroz izostanak statističke značajnosti razlika tokom uzastopnih dana ispitivanja. Statistička značajnost razlika u vrednosti relativne zastupljenosti IGFBP-3 ustanovljena je od trećeg do sedmog dana, poređenjem sa vrednostiam određenim na dan rađanja. Najniža vrednost ustanovljena je sedmog dana i ona se statistički značajno razlikovala u odnosu na vrednosti nultog, prvog i drugog dana života, a nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na vrednosti dobijene trećeg i četvrtog dana ispitivanog perioda.

U tabeli 5.8.6. prikazana je statistička značajnost razlika između relativne zastupljenosti IGFBP-3 utvrđenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.8.6. Statistička značajnost razlika između relativne zastupljenosti IGFBP-3 ustanovljenih unutar ogledne grupe teladi.

Starost teladi	0				
1	NZ	1			
2	NZ	NZ	2		
3	NZ	NZ	NZ	3	
4	NZ	NZ	NZ	NZ	4
7	NZ	NZ	NZ	NZ	*

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Izostanak značajnost razlike između uzastopnih dana merenja ukazuje na postepeni pad relativne zastupljenosti IGBP-3 koji je trajao do četvrtog dana života. Nakon toga došlo je do povećanja relativne zastupljenosti IGBP-3 do sedmog dana kada su vrednosti dostigle najviši nivo u ispitivanom periodu, s tim da su se statistički značajno razlikovale u odnosu na vrednosti određene četvrtog dana neonatalnog života.

5.9. Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu teladi

Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe je prikazana u tabeli 5.9.1.

Tabela 5.9.1. Koncentracija ukupnih proteina (g/l) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, izražena kao $\bar{X} \pm SE$ uz prikaz statističke značajnosti razlika

Starost teladi	Koncentracija ukupnih proteina(g/l)		Značajnost razlika između kontrolne I ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	45,70 ± 2.15	43,59 ± 3.00	NZ
1	49,70 ± 2.79	46,63 ± 3.46	NZ
2	57,99 ± 2.18	51,64 ± 2.84	NZ
3	59,25 ± 2.19	51,32 ± 2.88	p < 0,05
4	65,55 ± 4.66	52,55 ± 2,77	p < 0,05
5	65,46 ± 3.89	51,73 ± 2.68	p < 0,01
6	64,25 ± 3.74	52,33 ± 2.98	p < 0,05
7	61,63 ± 2.17	52,31 ± 2.96	p < 0,05

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz tabele 5.9.1. se zapaža da se koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe nije statistički značajno razlikovala do drugog dana nakon rađanja, iako su koncentracije kod ogledne grupe tokom prva dva dana života bile numerički niže nego kod kontrolne grupe. Od trećeg do sedmog dana, ustanovljene su statistički značajno niže koncentracije kod teladi ogledne grupe. Najviše vrednosti ukupnih proteina kod obe grupe teladi ustanovljene su četvrtog dana neonatalnog života.

U tabeli 5.9.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija ukupnih proteina ustanovljenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.9.2. Statistička značajnost razlika između koncentracije ukupnih proteina unutar kontrolne grupe teladi

Dan Neonatalnog života	0							
1	NZ	1						
2	***	*	2					
3	***	*	NZ	3				
4	**	**	NZ	NZ	4			
5	***	**	NZ	NZ	NZ	5		
6	***	**	NZ	NZ	NZ	NZ	6	
7	***	**	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	7

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0.05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu teladi kontrolne grupe postepeno se povećavala sve do četvrtog dana nakon čega je ustanovljen lagani pad koncentracije proteina do sedmog dana neonatalnog života. Vrednosti koncentracija tokom uzastopnih dana ispitivanja nisu se razlikovale značajno, izuzev vrednosti drugog dana kada su koncentracije statistički značajno porasle u odnosu na prvi dan. Vrednosti koncentracije nultog i prvog dan nakon rađanje se nisu značajno razlikovale, ali su bile statistički značajno niže u odnosu na kasnije ustanovljene vrednosti. Četvrtog dana neonatalnog života, ustanovljene su najviše vrednosti koncentracije ukupnih proteina. Ove vrednosti bile su statistički značajno više jedino u odnosu na vrednosti određene nultog i prvog dana neonatalnog života dok se nisu značajno razlikovale od ostalih izmerenih vrednosti tokom ispitivanog perioda.

U tabeli 5.9.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija ukupnih proteina ustanovljenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.9.3. Statistička značajnost razlika između koncentracije ukupnih proteina unutar ogleadne grupe teladi

Dan Neonatalnog života	0						
1	NZ	1					
2	NZ	NZ	2				
3	NZ	NZ	NZ	3			
4	*	NZ	NZ	NZ	4		
5	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	5	
6	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	6
7	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Koncentracije ukupnih proteina u krvi ogleadne grupe teladi imale su trend blagog porasta od dana teljenja do četvrtog dana života kada su koncentracije ukupnih proteina imale najvišu vrednost. Vrednosti četvrtog dana su se statistički značajno razlikovale u odnosu na vrednosti koncentracije određene nultog dana, ali se nisu značajno razlikovale u odnosu na ostale periode ispitivanja. Nakon četvrtog dana ustanovljen je lagani pad koncentracija proteina s time da se vrednosti nisu značajno razlikovale.

5.10. Koncentracija globulina (g/L) u krvnom serumu teladi

Koncentracija globulina u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe je prikazana u tabeli 5.10.1.

Tabela 5.10.1. Koncentracija globulina (g/L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, izražena kao $\bar{X} \pm SE$ uz prikaz statističke značajnosti razlika

Starost teladi	Koncentracija globulina(g/l)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	19,37 ± 0.60	16,17 ± 1.51	NZ
1	24,25 ± 1.66	18,40 ± 1.66	p < 0,05
2	28,88 ± 1.32	23,13 ± 1.85	p < 0,05
3	32,92 ± 1.58	25,09 ± 0.07	p < 0,01
4	34,55 ± 2.38	26,36 ± 1.72	p < 0,05
5	34,95 ± 2.17	28,17 ± 1.88	p < 0,05
6	33,79 ± 2.13	27,99 ± 2.06	p = 0,06
7	34,93 ± 2.12	28,63 ± 2.06	p < 0,05

NZ – razlika nije statistički značajna

Iz tabele 5.10.1. se zapaža da su koncentracije globulina u krvnom serumu teladi ogledne grupe u svim periodima ispitivanja, izuzev nultog dana, bile statistički značajno niže u odnosu na vrednosti određene kod kontrolne grupe istim periodima ispitivanja. Razlika u koncentracijama globulina određenih šestog dana bila je na granici statističke značajnosti između dve grupe.

U tabeli 5.10.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija globulina unutar kontrolne grupe u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.10.2. Statistička značajnost razlika između koncentracije globulina ustanovljenih u različitim periodima unutar kontrolne grupe teladi

Dan Neonatalnog života	0							
1	*	1						
2	***	*	2					
3	***	**	NZ	3				
4	***	**	*	NZ	4			
5	***	**	*	NZ	NZ	5		
6	***	**	NZ	NZ	NZ	NZ	6	
7	***	***	*	NZ	NZ	NZ	NZ	

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0.05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Koncentracija globulina u krvi teladi kontrolne grupe rasla je do petog dana neonatalnog života. Do drugog dana ustanovljen je značajan rast koncentracije globulina a od trećeg do petog dana ustanovljen je postepeni porast uz izostanak značajnost razlika koncentracije. Statistički značajne razlike u vrednosti koncentracije globulina između uzastopnih dana ispitivanja ustanovljene su nultog i prvog dana. U periodu od trećeg dana života do kraja ispitivanog perioda nisu ustanovljene statistički značajne razlike vrednosti koncentracija globulina.

U tabeli 5.10.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija globulina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe.

Tabela 5.10.3. Statistička značajnost razlika između koncentracije globulina ustanovljenih u različitim periodima unutar ogledne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0						
1	NZ	1					
2	**	NZ	2				
3	**	*	NZ	3			
4	***	**	*	NZ	4		
5	***	**	NZ	NZ	NZ	5	
6	***	**	NZ	NZ	NZ	NZ	6
7	***	**	*	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$;

Postepeni rast koncentracije globulina u serumu teladi ogledne grupe do petog dana uočava se zbog odsustva značajnost razlike u vrednostima dobijenim tokom uzastopnih merenja . Nakon petog dana ustanovljen je blagi, statistički neznačajan, pad koncentracije. Statistički značajne razlike u koncentracijama globulina postojale su između vrednosti ustanovljenih nultog i prvog dana života, u odnosu na sve kasnije ustanovljene vrednosti, izuzev kada je u pitanju razlika između nultog i prvog dana života.

5.11. Koncentracija albumina (g/L) u krvnom serumu teladi

Koncentracija albumina u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe, je prikazana u tabeli 5.11.1.

Tabela 5.11.1. Koncentracija albumina (g/L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, izražena kao $\bar{X} \pm SE$ uz prikaz statističke značajnosti razlika

Starost teladi	Koncentracija ukupnih albumina (g/l)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	26,33 ± 1.82	27,42 ± 1.66	NZ
1	25,45 ± 1.26	28,23 ± 1.96	NZ
2	29,11 ± 0.89	28,51 ± 2.23	NZ
3	26,33 ± 0.76	26,23 ± 2.09	NZ
4	31,00 ± 2.41	26,19 ± 2.20	NZ
5	30,51 ± 2.88	23,56 ± 1.78	p = 0,05
6	30,46 ± 1.77	24,34 ± 1.97	p < 0,05
7	26,70 ± 1.95	23,68 ± 1.81	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Podaci prikazani u tabeli 5.11.1. ukazuju da tokom prvih četiri dana, kao i sedmog dana ispitivanog perioda, nije ustanovljena statistički značajna razlika između koncentracija albumina kontrolne i ogledne grupe teladi. Vrednosti ustanovljene na dan teljenja i prvog dana života kod teladi kontrolne grupe bile su niže, a od drugog dana do kraja ispitivanog perioda više u odnosu na vrednosti ustanovljene kod teladi ogledne grupe. Razlike ovih vrednosti nisu bile statistički značajne izuzev petog i šestog dana neonatalnog života kada je razlika bila statistički značajna.

U tabeli 5.11.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija albumina ustanovljenih unutar kontrolne grupe u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.11.2. Statistička značajnost razlika između koncentracije albumina ustanovljenih u različitim periodima unutar kontrolne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0						
1	NZ	1					
2	NZ	*	2				
3	NZ	NZ	***	3			
4	NZ	NZ	NZ	NZ	4		
5	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	5	
6	NZ	*	NZ	*	NZ	NZ	6
7	NZ	NZ	MZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Koncentracija albumina u serumu teladi kontrolne grupe imala je varijabilan trend tokom prva tri dana života, s tim da je nakon blagog neznačajnog pada prvog dana usledio statistički značajan porast koncentracije albumina drugog dana neonatalnog života. Nakon drugog dana ustanovljen je pad koncentracije albumina, s tim da je razlika vrednosti koncentracija drugog i trećeg dana bila statistički značajna. Nakon trećeg dana koncentracije albumina su rasle, ne značajno, do četvrtog dana kada je došlo do stabilizacije koncentracije sve do šestog dana. Koncentracije albumina sedmog dana bile su niže u odnosu na šesti dan, s tim da ova razlika nije bila statistički značajna. Vrednosti koncentracije albumina nultog dana nisu se značajno razlikovale u odnosu na vrednosti određene u ostalim periodima ispitivanja.

U tabeli 5.11.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija albumina ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar ogledne grupe.

Tabela 5.11.3. Statistička značajnost razlika između koncentracije albumina ustanovljenih u različitim periodima unutar ogledne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0						
1	NZ	1					
2	NZ	NZ	2				
3	NZ	NZ	NZ	3			
4	NZ	NZ	NZ	NZ	4		
5	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	5	
6	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	6
7	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0,001;

Koncentracija albumina u krvi teladi ogledne grupe imala je trend rasta do drugi dan kada je koncentracija dostigla najvišu vrednost, da bi nakon drugog dana postepeno opadala prema kraju ispitivanog perioda. Promene koncentracija albumina u krvi teladi ogledne grupe tokom ispitivanog perioda bile su relativno male, o čemu govori i izostanak statističke značajnosti razlika u vrednostima ustanovljenim u različitim danima ispitivanog perioda.

5.12. Koncentracija triglicerida (mmol/L) u krvnom serumu teladi

Koncentracija triglicerida u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe, je prikazana u tabeli 5.12.1.

Tabela 5.12.1. Koncentracija triglicerida (mmol/L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, izražena kao $\bar{X} \pm SE$ uz prikaz statističke značajnosti razlika

Starost teladi	Koncentracija ukupnih triglicerida (mmol/l)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	0,35 ± 0,03	0,69 ± 0,04	p < 0,001
1	0,40 ± 0,03	0,89 ± 0,04	p < 0,001
2	0,54 ± 0,04	0,97 ± 0,06	p < 0,001
3	0,63 ± 0,04	0,91 ± 0,06	p < 0,01
4	0,70 ± 0,04	0,97 ± 0,07	p < 0,01
5	0,73 ± 0,06	1,34 ± 0,09	p < 0,001
6	0,83 ± 0,07	1,19 ± 0,08	p < 0,01
7	0,63 ± 0,05	0,88 ± 0,06	p < 0,01

Iz tabele 5.12.1 zapaža se da su koncentracije triglicerida u serumu teladi kontrolne grupe bile statistički značajno niže tokom čitavog perioda istraživanja u poređenju sa koncentracijama ustanovljenim kod ogledne grupe teladi. Manji stepen značajnosti razlike ustanovljen je između ogledne i kontrolne grupe trećeg, četvrtog, šestog i sedmog dana neonatalnog života.

U tabeli 5.12.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija triglicerida ustanovljenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.12.2. Statistička značajnost razlika između koncentracija triglicerida ustanovljenih u različitim periodima unutar kontrolne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0							
1	NZ	1						
2	**	*	2					
3	***	***	NZ	3				
4	***	***	*	NZ	4			
5	***	***	*	NZ	NZ	5		
6	***	***	**	*	NZ	NZ	6	
7	***	**	NZ	NZ	NZ	NZ	*	

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0.05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Koncentracija triglicerida u krvi teladi kontrolne grupe imala je trend postepenog rasta od dana teljenja do šestog dana života, kada je dostigla najviša vrednost. Vrednosti ustanovljene na dan rađanja i prvog dana nakon rađanja bile su statistički značajno niže u odnosu na sve kasnije ustanovljene vrednosti, dok statistička razlika vrednosti koncentracija triglicerida između nultog i prvog dana je izostala. Takođe, statistički značajno niže koncentracije triglicerida bile su ustanovljene drugog dana u odnosu na koncentracije četvrtog, petog i šestog dana neonatalnog života. Koncentracije triglicerida kod teladi kontrolne grupe sedmog dana bile su značajno niže u odnosu na koncentracije šestog dana ispitivanog perioda.

U tabeli 5.12.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija triglicerida ustanovljenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 6.12.3. Statistička značajnost razlika između koncentracija triglicerida ustanovljenih u različitim periodima unutar ogledne grupe teladi

Dan Neonatalnog Života	0						
1	**	1					
2	**	NZ	2				
3	*	NZ	NZ	3			
4	**	NZ	NZ	NZ	4		
5	***	***	**	**	**	5	
6	***	**	NZ	*	NZ	NZ	6
7	*	NZ	NZ	NZ	NZ	***	**

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

Nakon rađanje koncentracije triglicerida statistički su značajno porasle do prvog dana života nakon čega se trend rasta produžio do drugog dana ali ne značajno u odnosu na prvi dan, ali statistički značajno u odnosu na nulti dan. Nakon drugog dana vrednosti koncentracija triglicerida su postepeno i neznačajno padale do trećeg dana. Nakon trećeg dana koncentracije su rasle postepeno do četvrtog dana, da bi petog dana dostigle najvišu vrednost koja je bila statistički značajno viša u odnosu na vrednosti triglicerida ustanovljene u svim prethodnim merenjima. Nakon petog dana koncentracije triglicerida je neznačajno opala do šestog dana. Koncentracije određene sedmi dan su bile značajno niže u odnosu na vrednosti petog i šestog dana. Vrednosti koncentracije triglicerida ustanovljene na dan teljenja bile su statistički značajno niže u odnosu na sve kasnije ustanovljene vrednosti.

5.13. Koncentracija holesterola (mmol/L) u krvnom serumu teladi

Koncentracija holesterola u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, kao i statistička značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe, je prikazana u tabeli 5.13.1.

Tabela 5.13.1. Koncentracija holesterola (mmol/L) u krvnom serumu teladi kontrolne i ogledne grupe, izražena kao $\bar{X} \pm SE$ uz prikaz statističke značajnosti razlika

Starost teladi	Koncentracija holestrola (mmol/l)		Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
0	0,72 ± 0,06	0,46 ± 0,04	p < 0,01
1	0,89 ± 0,07	0,67 ± 0,04	p < 0,05
2	1,74 ± 0,04	1,54 ± 0,05	p < 0,01
3	1,77 ± 0,04	1,66 ± 0,05	NZ
4	2,33 ± 0,08	1,73 ± 0,07	p < 0,001
5	2,44 ± 0,08	1,83 ± 0,09	p < 0,001
6	2,24 ± 0,08	2,12 ± 0,10	p < 0,01
7	2,44 ± 0,07	2,25 ± 0,11	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna

Podaci prikazani u tabeli 5.13.1. ukazuju da su koncentracije holesterola u krvi teladi kontrolne grupe bila statistički značajno više u odnosu na oglednu grupu teladi tokom čitavog perioda ispitivanja, izuzev trećeg i sedmog dana nakon teljenja, kada razlika nije bila statistički značajna, iako su numeričke vrednosti bile više kod kontrolne grupe teladi.

U tabeli 5.13.2. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija holesterola ustanovljenih u različitim periodima ispitivanja unutar kontrolne grupe.

Tabela 5.13.2. Statistička značajnost razlika između koncentracije holesterola ustanovljenih unutar kontrolne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja

Dan neonatalnog života	0							
1	NZ	1						
2	***	***	2					
3	***	***	NZ	3				
4	***	***	***	***	4			
5	***	***	***	***	NZ	5		
6	***	***	***	***	NZ	NZ	6	
7	***	***	***	***	NZ	NZ	NZ	

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Koncentracija holesterola u krvi teladi kontrolne grupe imala je trend rasta tokom ispitivanog perioda. Vrednosti koncentracije holesterola nultog dana su bile statistički značajno niže u odnosu na sve kasnije ustanovljene periode izuzev vrednosti ustanovljene prvog dana. Značajan rast koncentracije ustanovljen je nakon prvog, do drugog dana, i u periodu od trećeg do četvrtog dana ispitivanja. Nakon četvrtog dana došlo je do stabilizacije koncentracija holesterola, s tim da je ustanovljen neznačajan rast do šestog dana. Najviše koncentracije holesterola ustanovljene su šestog dana nakon čega su vrednosti neznačajno opadale do kraja ispitivanog perioda. Statistička značajnost razlika u vrednostima ustanovljenim u različitim danima ispitivanog perioda izostala je između dana teljenja i prvog dana, drugog i trećeg dana, te u periodu od četvrtog dana do kraja ispitivanog perioda.

U tabeli 5.13.3. prikazana je statistička značajnost razlika između koncentracija holesterola ustanovljenih unutar ogledne grupe teladi u različitim periodima ispitivanja.

Tabela 5.13.3. Statistička značajnost razlika između koncentracija holesterola ustanovljenih u različitim periodima unutar ogledne grupe teladi

Dan neonatalnog života	0						
1	**	1					
2	***	***	2				
3	***	***	NZ	3			
4	***	***	*	NZ	4		
5	***	***	*	NZ	NZ	5	
6	***	***	***	***	**	NZ	6
7	***	***	***	***	**	*	NZ

NZ – razlika nije statistički značajna *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Koncentracija holesterola u krvi teladi ogledne grupe imala je trend značajnog rasta do drugog dana neonatalnog života. Nakon drugog dana koncentracije su rasle ali su razlike vrednosti između uzastopnih merenja do sedmog dana bile statistički neznačajne. Vrednosti koncentracija određene nultog i prvog dana bile su statistički značajno niže u odnosu na vrednosti dobijene pri svim ostalim merenjima do kraja ispitivanog perioda. Koncentracije određene sedmog dana dostigle su najvišu vrednost tokom ispitivanog perioda. Ta vrednost je bila statistički značajno viša u odnosu na vrednosti određene pri svim ostalim merenjima izuzev u odnosu na vrednosti određene šestog dana neonatalnog života.

5.14. Ekspresija iRNK za pojedine tipove dejodinaza u uzorcima tkiva placente i tkiva tireoidee teladi





U tabeli 5.14.1. prikazane su vrednosti za ekspresiju iRNK za DIO1, DIO2 i DIO3 u uzorcima tkiva placente majki kontrolne i ogledne grupe teladi, izražene u denzitometrijskim jedinicama (AU).

Tabela 5.14.1. Ekspresija iRNK za različite tipove dejodinaza u uzorcima tkiva placente majki kontrolne i ogledne grupe teladi, izražena kao $\bar{X} \pm SE$ uz prikaz statističke značajnosti razlika.

	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlika između kontrolne i ogledne grupe
DIO1 (AU)	0,653 ± 0,06	1,147 ± 0,37	p < 0,05
DIO2 (AU)	0,511 ± 0,11	1,540 ± 0,43	p < 0,001
DIO3 (AU)	0,718 ± 0,18	1,396 ± 0,43	p < 0,01

Podaci prikazani u tabeli 5.14.1. ukazuju da je ekspresija iRNK za sva tri tipa dejodinaza u uzorcima tkiva placente majki kontrolne grupe teladi bila statistički značajno niža u odnosu na majke ogledne grupe teladi. Zapaža se da je ta razlika bila najizraženija kod ekspresije iRNK za DIO2, a najmanje izražena kod ekspresije iRNK za DIO1.


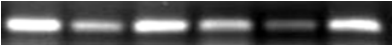
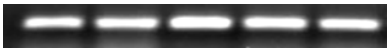

Na slici 5.14.1 prikazana je ekspresija iRNK za DIO1 u uzorcima tkiva placente majki teladi kontrolne i ogledne grupe. Prikaz je izvršen zajedno sa ATP5B proteinom koji je korišćen kao standard.

	Kontrolna grupa	Ogledna grupa
DIO1		
ATP5B		

Slika 5.14.1. Ekspresija iRNK za DIO1u uzorcima tkiva placente majki teladi kontrolne i ogledne grupe.

Na slici 5.14.1. zapaža se da je ekspresija iRNK za DIO1u uzorcima tkiva placente ustanovljena i kod majki kontrolne i ogledne grupe.


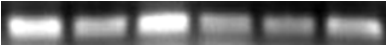


Na slici 5.14.2 prikazana je ekspresija iRNK za DIO2 u uzorcima tkiva placente majki teladi kontrolne i ogledne grupe. Prikaz je izvršen zajedno sa ATP5B, proteinom koji je korišćen kao standard.

	Kontrolna grupa	Ogledna grupa
DIO2		
ATP5B		

Slika 5.14.2. Ekspresija iRNK za DIO2 u uzorcima tkiva placente majki teladi kontrolne i ogledne grupe

Na slici 5.14.2. zapaža se da je ekspresija iRNK za DIO2 u uzorcima tkiva placente ustanovljena i kod majki teladi kontrolne i ogledne grupe, pri čemu je ekspresija iRNK za DIO2 kod majki teladi kontrolne grupe detektovana u tragovima.







Na slici 5.14.3 prikazana je ekspresija iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva placente majki teladi kontrolne i ogledne grupe. Prikaz je izvršen zajedno sa ATP5B, proteinom koji je korišćen kao standard.

	Kontrolna grupa	Ogledna grupa
DIO3		
ATP5B		

Slika 5.14.3. Ekspresija iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva placente majki teladi kontrolne i ogledne grupe.

Na slici .14.3. zapaža se da je ekspresija iRNK za DIO3 u uzorcima tkiva placente ustanovljena i kod majki teladi kontrolne i ogledne grupe. Pri tome je ekspresija iRNA za DIO3 u tkivima placente bila izraženija u svim uzorcima poreklom od majki teladi ogledne grupe u poređenju sa kontrolnom grupom.

Na slici 5.14.3. prikazana je ekspresija iRNK za sva tri tipa dejodinaza u uzorcima tkiva tireoidee novorođenih teladi na dan teljenja. Prikaz je izvršen zajedno sa ATP5B, proteinom koji je korišćen kao standard.

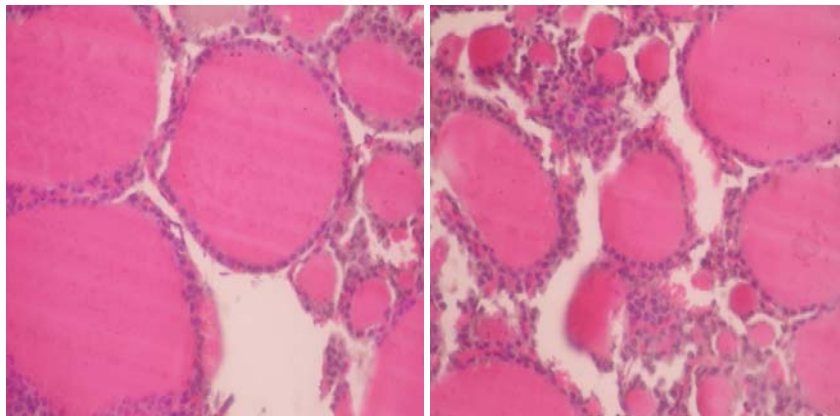
	Kontrolna Ogledna	Kontrolna Ogledna	Kontrolna Ogledna		
DIO1		DIO2		DIO3	
ATP5B		ATP5B		ATP5B	

Slika 5.14.3. Ekspresija iRNK za DIO1, DIO2 i DIO3 u uzorcima tkiva tireoidee teladi kontrolne i ogledne grupe.

Na slici .14.3. zapaža se da je ekspresija iRNK za DIO1 i DIO2 ustanovljena u uzorcima tkiva tireoidee kod teladi obe grupe teladi, dok iRNK za DIO3 nije bila eksprimirana u ispitanim uzorcima tireoidee ni kod jedne grupe teladi.

5.15. Histološka analiza odabranih uzoraka tkiva tireoidee teladi

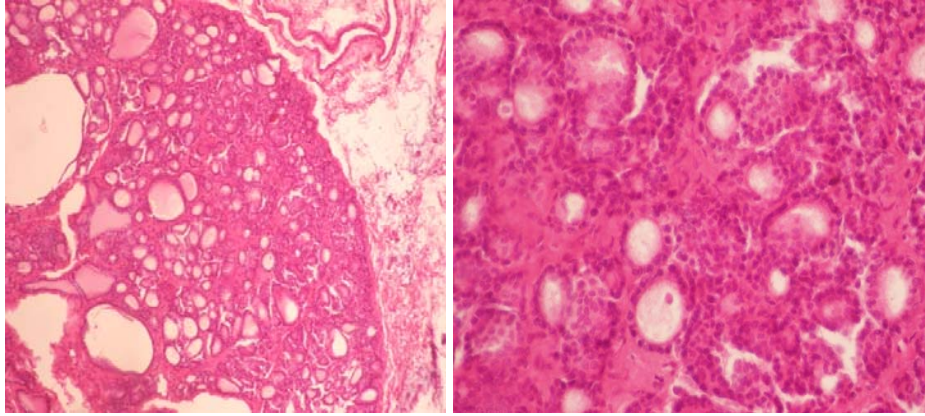
Na slici 5.15.1. prikazane su histološke karakteristike tkiva tireoidee teladi kontrolne grupe.



Slika 5.15.1. Tkivo tireoidee teladi kontrolne grupe (Hematoksilin/eozin, uvećanje 100 puta)

Na slici 5.15.1. uočava se da u tkivu tireoidee teladi postoje jasno izraženi i krupni folikuli, oivičeni prizmatičnim epitelom, i ispunjeni značajnom količinom koloida, koji se jasno boji acidofilnim histološkim bojama. U stromi žlezde se jasno uočavaju fibroblasti, kolagena vlakna i veći broj krvnih sudova.

Na slici 5.15.3 prikazane su histološke karakteristike tkiva tireoidee teladi ogledne grupe.



Slika 5.15.3. Tkivo tireoidee novorođena teladi ogleadne grupe (Hematoksilin/eozin, uvećanje 100 puta)

Na slici 6.15.3. se uočava da u tkivu tireoidee teladi ogleadne grupe postoji veliki broj manjih folikula, koji se mogu okarakterisati kao mikrofolikuli sa malim lumenom, zatim određeni broj folikula bez lumena, kao i manji broj neaktivnih makrofolikula obloženih prizmatičnim ili skvamoznim epitelom, koji su bili ispunjeni manjom količinom bazofilnog koloida ili su bili bez pristustva koloida. Između folikula se može uočiti vezivno tkivo sa manjim brojem krvnih sudova. U svega nekoliko makrofolikula bila je prisutna slabo izražena vakuolizacija koloida. Ukupna histološka slika u ispitanim uzorcima tkiva tireoidee teladi ogleadne grupe ukazuje na hiperplaziju žlezde, na šta posebno ukazuje veliki broj sitnih folikula.

6. Dikusija

Hipotireoza je relativno česta pojava u intenzivnom odgoju goveda, i uglavnom nastaje kao rezultat nedostatka joda ili uzimanja hrane koja sadrži goitrogene materije (Sinovec, Jovanović, 2002; Anderson i sar., 2007). Nutritivni status majke tokom graviditeta je od suštinskog značaja za pravilan prenatalni razvoj ploda i rađanje vitalne teladi. Zadovoljenje potrebe za jodom kod majke takođe je značajan faktor za pravilan razvoj i aktivnost tireoidne osovine kod prenatalne i neonatalne teladi. Hipotireoidizam majke odražava se na tireoidni status novorođene teladi tako da se telad rađaju u stanju hipotireoze, što potvrđuju i povišene koncentracije TSH (Guyot i sar., 2007). Hipotireoidizam ima za posledicu narušavanje endokrinog i metaboličkog statusa teladi, a time i poremećaj adaptacionih mehanizmama tokom postnatalnog perioda i rađanja slabo vitalne teladi (Radostits i sar., 2007).

Većina istraživanja funkcionisanja tireoidne osovine kod novorođene teladi odnose se na njeno prenatalno i postnatalno sazrevanje, trend promena tireoidnih hormona, endokrine i metaboličke promene tokom postnatalnog perioda života u fiziološkim uslovima (Hernandez i sar. 1972; Davicco i sar. 1982; Stojić i sar. 2002; Kirovski i sar. 2011).

Istraživanja poremećaja tireodne osovine uglavnom se odnose na epidemiološki značaj nedostatka joda, i njegov uticaj na tireoideu, pojavu strume i tireoidni status neonatalne teladi (Seimiya i sar. 1991; Takahashi i sar. 2000). Prema našim saznanjima, u literaturi nisu dostupni podaci koje se odnose na efekat hipotireoze indukovane davanjem farmakoloških supstanci ili unosom goitrogenih supstanci na endokrini i metabolički status novorođene teladi tokom neonatalnog perioda života. Imajući u vidu da je nedostatak joda najčešće hronične prirode i na organizam ploda obično deluje tokom celog graviditeta, kao i kasnije tokom neonatalnog života, za očekivati je da će promene u aktivnosti tireoidee i tireoidne osovine nastale kao rezultat unosa prirodnih goitrogena ili farmakoloških antitireoidnih supstanci biti uslovljene intenzitetom i trajanjem izlaganja delovanju tih supstanci, te će i krajnji efekat na endokrini i metabolički status teladi biti drugačiji u odnosu na promene uzrokovane deficitom joda.

6.1. Uticaj prenatalnog tretmana sa PTU na tireoidni status teladi

Uticaj hipotireoze majke na tireoidni status novorođene životinje može se ispitivati metodama manipulacije tireoidne osovine, odnosno veštačkim suprimiranjem sinteze i/ili sekrecije tireoidnih hormona (Villar i sar. 2002). Naime, davanjem farmakoloških doza antitireoidnih supstanci kod krava, omogućava se analiza efekta indukcije hipotireoze u periodu gestacije na sazrevanje i funkciju tireoidne osovine kod prenatalne i neonatalne teladi a time i na posledice hipotireoze tokom neonatalnog perioda. Prema navodima iz literature, supstanca izbora za indukciju hipotireoznog stanja kod preživara je PTU (Villar i sar. 2002). Istraživanja uticaja supresije aktivnosti tireoidne osovine na proizvodne i reproduktivne karakteristike tovnih rasa goveda sprovedena su indukovanjem hipotireoze primenom PTU, o čemu u literaturi postoji određeni broj referenci (DeMoraes i sar 1998 ; Thrift i sar 1999a,b ; Bernal i saradnici 1999), primarno u pogledu uticaja davanja antitireoidnih supstanci na dnevni prirast i postizanje puberteta. Međutim, prema našim saznanjima, u literaturi nisu dostupni podaci o upotrebi antitireoidnih supstanci kod goveda kombinovanih i mlečnih rasa, kod kojih je dugogodišnja selekcija na proizvodnju mleka uslovlila da adaptacioni mehanizmi funkcionišu nešto drugačije u odnosu na goveda tovnih rasa. Praktično jedina dostupna referenca u literaturi o upotrebi PTU kod mlečnih rasa goveda je rad Stewarta i saradnika (1994), koji su koristili PTU sa ciljem utvrđivanja uticaja aktivnosti tireoidee na koncentraciju polnih hormona i manifestne znakove estrusa junica holštajn rase. Takođe, u literaturi nedostaju podaci koje se odnose na primenu PTU kod krava u peripartalnom periodu i mogućnost placentarnog transfera PTUa, sa posledičnim efektima na plod. Podaci o uticaju PTU na plod tokom graviditeta i laktacije, uglavnom potiču iz humane medicine, gde se zna da PTU prolazi kroz placentarnu barijeru u veoma malim koncentracijama i da uobičajene terapijske koncentracije za kontrolu tireoidnog statusa majke ne utiču značajnije na aktivnost tireoidne osovine ploda (Mortimer i sar. 1997). Veća osetljivost na PTU utvrđena je tokom poslednjeg trimestra graviditeta, kada je utvrđeno i naizraženije ispoljavanje efekta PTU na aktivnost tireoidne osovine ploda (Mandel i Cooper, 2001). Pri tome svakako treba imati u vidu činjenicu da je placenta ljudi zbog svog tipa (placenta hemochorialis) propustljivija za različite materije u odnosu na nešto čvršću placentarnu

barijeru koja postoji kod preživara (placenta syndesmochorialis) (Peter, 2013). Slično je i sa podacima vezanim za transfer PTU u mleko, koji su dostupni za humanu populaciju, ali ne i za ekonomski važne vrste od kojih se dobija mleko. Naime, literaturni podaci ukazuju na to da PTU smanjuje proizvodnju mleka i menja sastav mleka kod krava, pri čemu su konkretni podaci o stepenu transfera i koncentracijama PTU u mleku veoma oskudni (Chanda i sar 1952; Thrift i sar 1999a).

Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da davanje PTU majkama tokom poslednjih 20 dana graviditeta, pored negativnog efekta na tireoidnu osovину majke ostvaruje i značajan efekat na aktivnost tireoidne osovine njihove prenatalne i neonatalne teladi. Naime, telad tretiranih majki su rođena u hipotireoidnom stanju o čemu govore značajno niže koncentracije T_3 i T_4 , kao i značajno više koncentracije TSH u odnosu na kontrolnu grupu teladi.

Davanje PTU junicama u dozi od 4mg/kg telesne težine dnevno tokom poslednjih 20 dana graviditeta, dovelo je do statistički značajnog pada koncentracija tireoidnih hormona u krvi (Savić, 2012). Pomenuti tretman izazvao je istovremeni pad koncentracija T_3 i T_4 , što govori o negativnom efektu navedene doze PTU na sintezu tireoidnih hormona u samoj tireoidnoj žlezdi, kao i o inhibiciji periferne dejodinacije tireoidnih hormona u tkivima (Taurog 1996; Thrift i sar. 1999).

Koncentracije tireoidnih hormona na dan rođenja kod teladi poreklom od majki tretiranih sa PTU bile su statistički značajno niže u odnosu na koncentracije tireoidnih hormona ustanovljenih kod teladi kontrolne grupe. Prema literaturnim podacima, telad se rađaju sa relativno visokim koncentracijama tireoidnih hormona koji mogu biti i statistički značajno više u odnosu na koncentracije tireoidnih hormona kod odraslih grla, što je najverovatnije posledica prisustva rezervi tireoidnih hormona, sintetisanih tokom fetalnog perioda razvoja (Stojić i sar. 2002; Kirovski i sar. 2011; Takahashi i sar. 2001; Stojić i sar. 2005). Visoke koncentracije tireoidnih hormona u prvim danima nakon rođenja su takođe i posledica visokih koncentracija TSH u prvim satima nakon rađanja, kao i postnatalne adrenergične stimulacije i povećane aktivnosti periferne 5' dejodinaze (Guyot i sar. 2007a; de Jesus i sar. 2001 ; Nicol i sar. 1994). Trend promena koncentracija tireoidnih hormona kontrolne grupe u našem istraživanju je bio u saglasnosti sa rezultatima navedenih autora.

Koncentracija T_4 u krvi ogledne grupe teladi bila je statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu teladi tokom prva dva dana života, i pored toga je i u ovoj grupi koncentracija T_4 nakon prvog dana blago porasla. Sličan trend kretanja je utvrđen i za koncentraciju T_3 , koja se već drugog dana nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu. Ovaj trend promena tireoidnih hormona u krvi ogledne grupe teladi nastavio se i trećeg dana neonatalnog života, da bi četvrtog dana koncentracije tireoidnih hormona postigle maksimalne vrednosti koji su, posebno za T_3 , bile statistički značajno više u odnosu na ranije vrednosti unutar grupe. Trend promena tireoidnih hormona kod teladi ogledne grupe ukazuje na kompenzatorni efekat i aktivaciju mehanizma negativne povratne sprege tireoidne osovine, koji su se aktivirali kao odgovor organizma na prenatalnu inhibiciju sinteze i sekrecije hormona tireoidee, kao i smanjenje intenziteta njihove periferne dejodinacije uzrokovane delovanjem PTU.

Da je opisani kompenzatorni efekat postojao i da je aktivacija mehanizma negativne povratne sprege u lučenju tireoidnih hormona logično objašnjenje za trend promena koncentracije tireoidnih hormona u krvi teladi ogledne grupe, ukazuju i vrednosti koncentracije TSH na dan teljenja, koje su kod ogledne grupe teladi bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu. Guyot i saradnici (2007b) smatraju da je koncentracija TSH značajan indikator hipotireoidizma kod neonatalne teladi, potvrđujući to nalazom povišene koncentracije TSH kod teladi sa kongenitalnom hipotireozom uzrokovanom nedostatkom joda. Trend opadanja koncentracije TSH kod ogledne grupe teladi trajao je sve do četvrtog dana nakon teljenja, nakon čega se koncentracija TSH stabilizovala prateći pri tome trend promene koncentracije tireoidnih hormona, posebno T_3 . Povećanje koncentracije T_3 u krvi ogledne grupe teladi, posebno od trećeg dana nakon teljenja, najverovatnije je posledica pojačane periferne konverzije T_4 u T_3 , odnosno pojačane aktivnosti 5' dejodinaze (DIO1), koja je tokom perioda delovanja PTU bila suprimirana. Ovaj nalaz je u skladu sa podacima koje navode Klein i saradnici (1980), koji su ustanovili da je preko 60% povećanja koncentracije T_3 u krvi novorođene jagnjadi nastalo kao rezultat pojačane aktivnosti dejodinaza u perifernim tkivima, dok ostatak pripisuju stimulativnom efektu TSH.

Aktivacija tireoidnih hormona tokom ranog neonatalnog perioda pod dejstvom dejodinaza posebno je značajna za iskorištavanje rezervi energije deponovanih u vidu mrkog masnog tkiva, koje pokazuje intenzivnu dejodinaznu aktivnost (Giralt i sar.,

1989). Isti autori su upotrebom PTU dokazali da dejodinaznu aktivnost u mrkom masnom tkivu preživara primarno obavlja DIO1, čije se dejstvo pod uticajem PTU lako suprimira, a sa njom se smanjuje i koncentracija aktivnog T_3 u tkivu. Pri tome treba imati u vidu da PTU inhibira aktivnost DIO1 (kao kompetitivni inhibitor, zauzimajući aktivno mjesto na molekulu enzima), ali ne i njenu sintezu, odnosno ekspresiju iRNK za DIO1, koja je regulisana koncentracijom T_3 u tkivu i koncentracijom TSH (Maia i sar., 2011), i povećava se kao jedan od kompenzatornih odgovora organizma na tretman sa PTU. U tom smislu, povišena ekspresija iRNK za DIO1 (ali i druge tipove dejodinaza) u tkivima i aktivacija većeg broja molekula DIO1 u tkivima nakon prestanka delovanja PTU može biti jedan od uzroka naglog povišenja koncentracije T_3 u perifernoj cirkulaciji, koje je kod teladi ogledne grupe ustanovljeno nakon trećeg dana neonatalnog života.

Povećani indeks ekstratireoidne konverzije, koji u fiziološkim uslovima značajno raste od rođenja do prvog napajanja (Kirovski i sar. 2011), u ovom istraživanju je izrazit nakon trećeg dana neonatalnog života, kada dolazi do opadanja vrednosti odnosa T_4/T_3 , odnosno intenzivnijeg porasta koncentracije T_3 u odnosu na porast koncentracije T_4 . Villar i saradnici (2002) ukazuju da sniženje odnosa T_4/T_3 ukazuje na negativni uticaj PTU na sintezu i sekreciju hormona na nivou tireoidee, dok povećanje ovog odnosa ukazuje na negativni uticaj PTU na perifernu inhibiciju dejodinacije, iz čega proizilazi da se određivanjem ovog odnosa mogu jasno razdvojiti centralni i periferni efekat PTU na koncentraciju tireoidnih hormona. Na osnovu ovakvog tumačenja rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da je kod teladi ogledne grupe prenatalni tretman sa PTU imao centralni efekat na koncentraciju tireoidnih hormona, inhibirajući njihovu sintezu na nivou tireoidee, odnosno da je kod ove grupe teladi prenatalni tretman sa PTU doveo do razvoja primarne hipotireoze. U prilog ovakvom tumačenju je i nalaz povišene koncentracije TSH kod ove grupe teladi, koja je za posledicu imala razvoj morfoloških promena na tkivu tireoidee.

Prenatalno hipotireozno stanje je kod teladi ogledne grupe dovelo do nastanka patomorfoloških i patohistoloških promena u tkivu tireoidee, u vidu bilateralnog difuznog povećanja tireoidee, analognog onome koje se u literaturi navodi kao posledica nedostatka joda u obroku gravidnih majki. Takahashi i saradnici (2000) opisuju slično bilateralno povećanje tireoidee kod novorođene teladi sa endemskom gušavošću, pri

čemu su utvrdili difuzno hiperplastično povećanje tireoidnog tkiva. Slične patomorfološke i patohistološke promene opisuju i Morinaga i saradnici (1990), i Seimiya i saradnici (1991). Poznato je da je adekvatna dostupnost i odgovarajuća snabdevenost jodom od suštinskog značaja za sintezu i sekreciju tireoidnih hormona, tako da deficit joda dovodi do pojave hipotireoze, i kompenzatorne hipertrofije i hiperplazije tireoidee. Sa druge strane, PTU direktno utiče na inhibiciju sinteze tireoidnih hormona blokiranjem oksidacije jodida i organifikacije joda i time dovodi do nedostatka intratireoidnog joda (Taurog, 2000). U oba slučaja, niske koncentracije tireoidnih hormona, posebno T₃, aktiviraju mehanizam negativne povratne sprege uz značajno povećanje koncentracije TSH, koji stimulatивно utiče na tireoideu i dovodi do morfoloških i funkcionalnih promena na njoj. Imajući to u vidu, može se zaključiti da su promene u tkivu tireoidee teladi ogleadne grupe (intenzivna difuzna hiperplazija tkiva tireoidee, sa dominantnim brojem mikrofolikula sa malim dijametrom i malim brojem relativno neaktivnih makrofolikula sa ili bez prisustva koloida u svom lumenu) bile uzorkovane delovanjem povišenih prenatalnih koncentracija TSH, odnosno prenatalnim tretmanom sa PTU.

Imajući u vidu da je kod preživara fetoplacentarna bariera nepropustljiva za tireoidne hormone, može se reći da je tireoidni status novorođene teladi potpuno zavisian od aktivnosti njihove sopstvene tireoidne osovine (Erenberg i sar. 1973¹). U tom smislu, podaci prikazani u ovom radu ukazuju da prenatalni tretman sa antitireoidnim supstancama može uticati na aktivnost tireoidne osovine, kako prenatalno, tako i u prvim danima neonatalnog života, a sa njom i na sposobnost adaptacije na uslove ekstrauterinog života. Pri tome treba imati u vidu da mali molekuli, kao što je PTU mogu proći kroz placentarnu barijeru, što je dokazano u humanoj populaciji (Mortimer i sar., 1997; Azizi i Amouzegar, 2011) i ukazuje na mogući rizik od pojave fetalnog hipotireoidizma tokom primene antitireoidnih preparata (Momotani i sar., 1997). Takođe, može se reći da PTU i slične supstance imaju tendenciju da se nakupljaju u tkivima sa intenzivnim metabolizmom (verovatno zbog pojačane dejodinazne aktivnosti), kao što su sva tkiva fetusa, što su dokazali Gardner i saradnici (1986), koji su nakon tretmana gravidnih žena sa PTU utvrdili da su koncentracije PTU veće u umbilikalnoj cirkulaciji u odnosu na koncentracije u cirkulaciji majke.

U literaturi postoji malo podataka o mogućnosti prolaska PTU kroz fetoplacentarnu barijeru kod preživara, koja se zbog samog tipa placente smatra manje propustljivom. Horger i saradnici (1976) navode da PTU kod gravidnih ovaca može dovesti do inhibicije aktivnosti fetalne tireoidee i razvoja strume, čime ukazuje na mogućnost transfera PTU kroz placentu kod preživara. Takođe je značajno napomenuti da su mlađe životinje osetljivije na dejstvo PTU u odnosu na starije, što je takođe dokazano i na ogleđima sa junadi (Rumsey i sar., 1985), što je najverovatnije posledica njihovog intenzivnijeg metabolizma i veće dejodinazne aktivnosti u tkivima. S obzirom da je efekat PTU na aktivnost tireoidne osovine dozno zavisian (Villar i sar., 2002), naši rezultati ukazuju da je placentarni transfer PTU tokom zadnjih 20 dana graviditeta bio u koncentracijama koje su bile dovoljne da bi uzrokovale supresiju funkcije fetalne tireoidee i sinteze tireoidnih hormona. Prema tome, doza PTU i vreme trajanja tretmana su značajni faktori koji utiču na postizanje koncentracije koja ispoljava supresivni efekat na fetalnu tireoideu, s obzirom da se 70-90% od ukupnog PTU nalazi vezano za proteine plazme (Cooper, 2005). Efekat PTU na fetalnu tireoideu, pored placentarnog transfera, omogućen je i deponovanjem PTU u tkivo fetalne tireoidee (Feng i sar., 1996).

Tretman sa PTU, prema rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, utiče na enzimsku konverziju, odnosno aktivaciju i deaktivaciju tireoidnih hormona na nivou placente, kroz efekat koji ostvaruje na dejodinaze. Rezultati ispitivanja ekspresije iRNK za različite tipove dejodinaza u ovom istraživanju su pokazali da je ekspresija placentarnih dejodinaza bila veća kod tretiranih majki u odnosu na netretirane. Prema našim saznanjima, u literaturi nisu dostupni radovi u kojima je ispitivana ekspresija i aktivnost dejodinaza u placenti kod goveda, dok za druge vrste postoje ograničeni podaci. Dosadašnja istraživanja ekspresije i aktivnosti dejodinaza placente kod pacova i čoveka su pokazala da je tokom graviditeta dominantni tip dejodinaze DIO3, što se smatra protektivnim mehanizmom koji obezbeđuje ograničenu dostupnost aktivnog oblika tireoidnih hormona fetusu, a time i postepeno i adekvatno sazrevanje tireoidne osovine tokom fetalnog perioda (Hernandez i sar., 2006; Marsilli i sar., 2011). Kurlak i saradnici (2013) su istraživali ekspresiju DIO3 u tkivu humane placente, a distribuciju i intenzitet ekspresije njene iRNK povezuju sa stepenom placentarne saturacije kiseonikom i stadijumom graviditeta. Istraživanjem ekspresije i aktivnosti dejodinaza u

tkivu placente žena u uslovima fetalne hipotireoze, Chen i saradnici (2003) nisu utvrdili promenu aktivnosti DIO3 i DIO2 i ekspresije iRNK za njih u placenti, što je bilo u saglasnosti sa literaturnim navodima da fetalna i maternalna koncentracija T_4 ne utiču na regulaciju aktivnosti placentalne DIO3, već da je glavni regulator ekspresije iRNK za DIO3 i njene aktivnosti koncentracija placentalnog T_3 . Pad aktivnosti i ekspresije DIO3 u placenti ovce krajem graviditeta objašnjavaju Forhead i saradnici (2006), koji su utvrdili da je povećanje fetalne koncentracije kortizola krajem graviditeta dovelo do pada ekspresije i aktivnosti placentalne DIO3 i povećane ekspresije i aktivnosti fetalne DIO1. Ovim mehanizmom maturacije, smanjuje se intenzitet inaktivacije T_3 u T_2 , čime se omogućava povećanje koncentracije T_3 krajem graviditeta. Forhead i saradnici (2006) su takođe utvrdili ekspresiju DIO2 u tkivu placente ovce krajem graviditeta, a to je u saglasnosti sa našim rezultatima o prisustvu DIO2 u tkivu placente kod majki kontrolne grupe. Ekspresija DIO2 omogućava povećanu dostupnost T_3 u tkivu placente, a što je potrebno radi povećane metaboličke potrebe placente krajem graviditeta (Koopdonk-Kool i sar., 1996ⁱⁱ). Wagner i saradnici (2007) navode da je koncentracija tireoidnih hormona dominantan regulator ekspresije iRNK za DIO2 i stepena/intenziteta njene dejodinazne aktivnosti. Aktivnost molekula DIO2 reguliše se posttranslacionom obradom molekula DIO2 u čemu značajnu direktnu ili indirektnu ulogu imaju i koncentracije hormona tireoidee (Gereben B i sar., 2008). Schröder-van der Elst i saradnici (1998) su ispitivanjem aktivnosti dejodinaza u placenti pacova, utvrdili povećanje aktivnosti DIO2 i DIO3 kod majki deficitarnih u jodu i tumače to kao posljedicu smanjene koncentracije lokalno sintetisanog T_3 , kao dominantnog regulatora aktivnosti placentalnih dejodinaza. Ukoliko se tumačenje ovih autora primijeni na rezultate dobijene u ovom istraživanju, niži stepen ekspresije iRNK za DIO3 u odnosu na ekspresiju iRNK za DIO2 se može smatrati mehanizmom koji omogućava povećanje produkcije aktivnog oblika tireoidnih hormona za potrebe intenzivnog metabolizma u tkivu placente. Takođe, ukoliko se imaju u vidu rezultati kortizolemije kod ogleadne i kontrolne grupe teladi, moglo bi se reći da je pomenuti mehanizam verovatno uzrokovan visokim koncentracijama kortizola fetusa na kraju graviditeta. Sa druge strane, Forehead i saradnici (2006) nisu utvrdili značajne razlike u aktivnosti DIO2 placente nakon tretmana majki dodatnim dozama kortizola, što ukazuje da kortizol sam za sebe ne utiče na aktivnost DIO2, te su verovatno primarni uzrok dominantne

ekspresije DIO2 povećane potrebe T_3 na nivou placente kod hipotireoznih majki. U prilog ovog objašnjenja su i nalazi povećane ekspresije DIO2 u tkivu mozga pilića i ovaca u stanju hipotireoze, kao i u masnom i mišićnom tkivu hipotireoznih jedinki koje se nalaze u stanju gladovanja (Rudas i sar., 2005; Martinez i sar., 2013).

Rezultati u našem radu ukazuju na ekspresiju DIO3 u tkivu placente netretiranih majki. Prema našim saznanjima u literaturi ne postoje podaci o ekspresiji DIO3 u bovinoj placenti sa kojima bi se mogli uporediti rezultati dobijeni u našem istraživanju. Objašnjenje ekspresije DIO3 u placenti visoko mlečnih krava moglo bi se povezati sa visokim koncentracijama estrogena utvrđenih na kraju graviditeta i početka teljenja (Bates i sar., 1999; Kester i sar., 2006). Značajno viša ekspresija DIO3 u tkivu placente kod majki tretiranih sa PTU mogla bi se objasniti povećanjem koncentracije T_3 u tkivu placente kao rezultat ekspresije DIO2 i aktivacije T_4 . Ovo objašnjenje moglo bi se potkrepiti i podatkom da povećanje tkivne dostupnosti T_3 dovodi do povećanja ekspresije DIO3, (Pallud i sar., 1999)

Ekspresija DIO1 karakteristična je za tkiva jetre, bubreg i tireoidee (Maia i sar., 2011). Bates i saradnici (1999) su takođe utvrdili ekspresiju DIO1 u tkivu placente pacova. Ispitivanjem ekspresije i aktivnosti ove dejodinaze u humanoj placenti, Chen i saradnici (2003) su utvrdili veoma nisku ekspresiju i aktivnost DIO1 na kraju graviditeta. Da je DIO 1 placente na kraju graviditeta slabo aktivna, ukazuju i ranija istraživanja gde se utvrdilo da PTU ne utiče na dejodinaciju unutrašnjeg prstena molekula T_4 (Castro i sar., 1985). Rezultati u ovom radu ukazuju na visoku ekspresiju DIO1 u tkivu placente kontrolne grupe, što bi se moglo objasniti povećanjem koncentracije T_3 u serumu majke na kraju graviditeta ako se zna da T_3 pozitivno reguliše ekspresiju DIO1 (Kim i sar., 1998; Maia i sar., 2011). Nalaz statistički značajno višeg stepena ekspresije iRNK za DIO1 u tkivu placente tretiranih junica u odnosu na netretirane je veoma interesantan, posebno u svetlu literaturnih navoda da ovaj tip dejodinaza pokazuje maksimalan stepen osetljivosti, dok se druga dva tipa smatraju neosetljivim na delovanje PTU. Pri tome je važno razgraničiti da PTU utiče na aktivnost DIO1, i to tako što se vezuje na aktivno mesto enzima i na taj način mu blokira delovanje, dok istovremeno ne deluje na ekspresiju iRNK za DIO1, odnosno na intenzitet translacionih i sintetskih procesa, koji određuju koliko će se molekula DIO1 sintetisati (Berry i sar., 1991; Kuiper i sar., 2006). Opisani nalaz ukazuje da se, kao

odgovor na tretman sa PTU, ekspresija iRNK za DIO1 u tkivu placente povisila, najverovatnije kao posledica aktivacije kompenzatornog mehanizma, odnosno pokušaja organizma da povišenom sintezom molekula DIO1 nadoknadi smanjenu dejodinaznu aktivnost, nastalu kao rezultat blokade aktivnih mesta na molekulu enzima i obezbedi dovoljne količine T₃ za potrebe tkiva (Kuiper i sar., 2005; Manna i sar 2013).

Ispitivanje ekspresije dejodinaze u tireoidei novorođene teladi izvršeno je na malom broju uzoraka. Rezultati ukazuju na intenzivnu ekspresiju DIO2 i ekspresiju DIO1 manjeg intenziteta, dok se DIO3 nije ekspimirala. Slične rezultati dobili su i Bates i saradnici (1999) koji su u tireoidei neonatalnih pacova utvrdili visok nivo aktivnosti 5' dejodinaze i veoma malu aktivnost 5' dejodinaza, s tim da više od 50% od ukupne aktivnosti 5' dejodinacije nije bilo osetljivo na PTU, što ukazuje na dominantnu ekspresiju DIO2. Ekspresiju DIO2 u tkivu tireoidee regulišu koncentracije tireoidnih hormona. Salvatore i saradnici (1996) navode da je intenzitet ekspresije DIO2 u tireoidei varijabilan zavisno do stepen stimulacije tireoidne aktivnosti. Niske koncentracije tireoidnih hormona i visoke koncentracije TSH u serumu teladi dovele su do stimulacije ekspresije a time i aktivnosti DIO2 u tkivu tireoidee, što je u saglasnost sa navodima Williams i saradnika (2011) koji ukazuju na povećanje ekspresije i aktivnosti DIO2 u tireoidei u stanju hipotireoze.

6.2. Uticaj prenatalnog tretmana sa PTU na glikemiju i hormone uključene u regulaciju glikemije (insulin i kortizol)

Koncentracija glukoze u krvi teladi predstavlja jedan od indikatora energetskeg statusa, a njeni osnovni regulatori, a istovremeno i dodatni indikator energetskeg statusa, su insulin i kortizol. Prilikom tumačenja nalaza glikemije, insulinemije i kortizolemije ustanovljenih u ovom istraživanju važno je imati na umu vrstu i uzrast životinja na kojima je sprovedeno, s obzirom da neonatalna telad imaju značajno više koncentracije glukoze u krvi, a sa njom i više nivoe insulina i kortizola, u odnosu na odrasla goveda, te da zbog toga i regulacija glikemije ima svoje specifičnosti (Ilgaža i Birgele, 2003). Svakako, za očekivati je da će promena energetskeg statusa jedinke, uzrokovana indukcijom hipotireoznog stanja, odnosno promena reaktivnosti tireoidne osovine, a sa njom i somatotropne osovine, uticati i na koncentracije glukoze, insulina i kortizola u krvi teladi, kao što je bio slučaj i sa IGF-1.

Telad ogleadne grupe su na dan teljena imala značajno niže koncentracije insulina u odnosu na kontrolnu grupu. Istovremeno, koncentracija insulina u krvi teladi kontrolne grupe bila je u skladu sa vrednostima koje su ustanovili Kirovski i saradnici (2008). Trend održavanja statistički značajno nižih vrednosti insulinemije u krvi teladi ogleadne u odnosu na telad kontrolne grupe održavao se zaključno sa drugim danom neonatalnog života, ali su te vrednosti ostale numerički niže i trećeg dana neonatalnog života, iako nije bilo statistički značajne razlike.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da hipotireoza dovodi do značajne promene sekrecije i senzitivnosti perifernih tkiva na delovanje insulina, koje su reverzibilne nakon vraćanje optimalne funkcije tireoidne osovine. Goulart-Silva i saradnici (2011) i Aguayo-Mazzucato i saradnici (2013) ukazuju da su tireoidni hormoni fiziološki regulator ekspresije mRNA za proinsulin i regulator maturacije β -ćelija pankreasa tokom postnatalnog perioda, iz čega proizilazi da je hipotireozno stanje jedan od razloga za usporeno sazrevanje mehanizama iskorištavanja glukoze. Isti autori su u in vitro uslovima utvrdili da T_3 povećava sekreciju insulina nakon stimulacije glukozom, što su povezali sa maturacionim efektom T_3 na β -ćelije pankreasa. Zaključci ovih autora mogu biti objašnjenje za trend kretanja koncentracije insulina, ustanovljen u ovom istraživanju, koji prati trend kretanja koncentracije tireoidnih hormona, posebno T_3 , odnosno intenziviranje bazalnog metabolizma teladi.

Pravovremeni unos kolostruma u optimalnoj količini povoljno utiče na koncentraciju insulina, podstičući na taj način anaboličke procese i iskorištavanje komponenti kolostruma. Da se u kolostrumu verovatno nalaze biološki aktivne materije koje potenciraju iskorištavanje njegovih komponenti govore i rezultati istraživanja koje su sprovedi Babitha i saradnici (2011) na teladi koju su napajali kolostrumom do tridesetog dana neonatalnog života, pri čemu su utvrdili održavanje visoke koncentracije insulina. Isti autori smatraju da su visoke koncentracije insulina ustanovljene u njihovom istraživanju rezultat dugotrajnog unosa visokoenergetske hrane bogate faktorima rasta i povećanih potreba za održavanje anaboličkih procesa u organizmu. Treba napomenuti i da endokrina funkcija pankreasa kod novorođene teladi nije u potpunosti razvijena, i da je unos kolostruma aktivira, ili preko nekog od faktora rasta koji se u njemu nalaze, ili preko unosa visokog sadržaja energije. Naime, Stanko i saradnici (1991) su utvrdili da je postprandijalno povećanje koncentracije insulina veće

tek nakon prvog dana od rođenja. Prema tome, povećanje koncentracije insulina u ovom periodu može se smatrati indikatorom koji ukazuje na metaboličko i endokrino prestrojavanje u organizmu teladi koje ima za cilj uspotavljenje optimalnog energetskeg bilansa.

Niske koncentracije insulina u prva dva dana nakon rođenja mogu se posmatrati i kao protektivni mehanizam koji obezbeđuje prilagođavanje jedinke na stresno stanje u momentu rođenja. Pad telesne temperature usled hladnoće značajno smanjuje koncentraciju insulina kod teladi. Godfrey i saradnici (1991) navode da niske temperature suprimiraju funkciju pankreasa što se može videti kroz niske postprandijalne koncentracije insulina. Značajno niže koncentracije insulina imaju za cilj održavanje koncentracije glukoze u krvi, kao značajnog energetskeg izvora za funkcionisanje vitalnih organa u tom kritičnom periodu života.

Koncentracije kortizola kod ogleadne grupe teladi tokom celog ispitivanog perioda bile su značajno više u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na postojanje stresnog stanja kod ove grupe teladi. Povećanje koncentracije kortizola je indikator stresnog stanja, kako ploda, tako i majke u momentu rođanja, i pokreće mehanizam koji je neophodan za incijaciju porođaja (Jacob i sar., 2001). Otežan porođaj i distocija mogu biti razlog visoke koncentracije kortizola kod novorođene teladi (Civelek i sar., 2008). U fiziološkim uslovima, kortizol je i značajan regulator glikemije, kroz smanjenje perifernog iskorištavanja glukoze i insulinsku rezistenciju perifernih tkiva, čime omogućava održavanje optimalne vrednosti glikemije (Hammon i sar., 2003). Istovremeno, kao i drugi glukokortikosteroidi, kortizol potencira glukoneogenezu, čime dodatno doprinosi očuvanju glikemije. Visoke koncentracije kortizola ustanovljene kod ogleadne grupe teladi u ovom istraživanju su nastale verovatno kao posledica pokretanja mehanizma koji nastoji da obezbedi dovoljne koncentracije glukoze kod hipotireozne teladi, a time i da poboljša njihov energetske status i obezbedi optimalne mehanizme adaptacije. Hipotireozno stanje eksperimentalne grupe teladi, uz nisku glikemiju, dovodi i do pada opšte metaboličke aktivnosti organizma što može biti dodatni razlog za nizak stepen maturacije adaptacionih mehanizmama i pojavu stresnog stanja zbog aktiviranja adrenokortikalne osovine. Istraživanja pokazuju da pravovremeni unos kvalitetnog kolostruma u prvim satima nakon rođenja utiče na koncentraciju kortizola (Stojić i sar., 2002; Hammon i Blum, 1998; Rauprich i sar., 2000). Ovi autori povećanje

koncentracije kortizola objašnjavaju potrebom za održavanje homeostaze glikemije u uslovima ograničenih rezervi energije i njenog ograničenog unosa putem obroka. U prilog ovome je i podatak da pravovremeni unos kolostruma u optimalnoj količini obezbeđuje i održavanje optimalne koncentracije glukoze u neonatalnom periodu (Steinhoff-Wagner J i sar., 2011). Utvrđeno je da indukovanje hipoglikemičnog stanja davanjem insulina kod fetusa ždrebadi (Silver i sar., 1995) i ovce (Edwards i sar., 2001) u poslednjoj fazi graviditeta povećava aktivnost adrenokortikalne osovine, što se manifestuje značajnim povećanjem koncentracije kortizola u krvi fetusa. Slični nalazi visoke kortizolemije utvrđeni su kod novorođenih beba sa izrazitom hipoglikemijom (Jakson i sar., 2004).

Na koncentraciju kortizola kod novorođene teladi, između ostalog, utiče i energetska status majke, najverovatnije posredno, preko stepena maturacije fetusa u poslednjoj fazi graviditeta. Osorio i saradnici (2013) su utvrdili visoke koncentracije kortizola pri rođenju kod teladi poreklom od majki koje su tokom poslednjih 20 dana graviditeta bile hranjene energetska deficitarnom hranom. Slični su i rezultati do kojih su došli Kirovski i saradnici (2009), da su telad rođena sa nižom telesnom masom imala više vrednosti kortizolemije, što se može dovesti u vezu i sa prevremenim porođajem. Treba napomenuti da su rezultati analize metaboličkog i endokrinog statusa gravidnih junica koje su primale PTU tokom poslednje faze graviditeta (Savić, 2012) pokazali da su te jединke u povoljnijem energetska statusu, što znači da status majke nije primarni razlog promene koncentracije kortizola kod novorođenčadi.

Vrednosti glikemije kod teladi kontrolne grupe na dan teljenja su bile niže u odnosu na ostala merenja tokom ispitivanog perioda, što je u saglasnosti sa navodima da novorođena telad u prvim satima nakon rađanja imaju relativno niske koncentracije glukoze u krvi (Oltner i Berglund, 1982; Kirovski i sar., 2008; Steinhoff-Wagner i sar., 2011). Održavanje optimalne koncentracije glukoze u periodu nakon rođenja uslovljen je optimalnim snabdevanjem glukozom putem placente u poslednjoj fazi fetalnog razvoja i stepena sazrevanja mehanizama endogene produkcije glukoze u postnatalnom periodu. Metaboličke promene koje se odnose na maturaciju endogene produkcije glukoze, glukoneogenezu i deponovanje glikogena u jetri, dominantno su regulisane kortizolom, kateholaminima i hormonima tireoidee, a u postnatalnom periodu značajnu

ulogu imaju i koncentracije glukagona i insulina. (Hammon i sar., 2012; Kirovski i sar., 2015)

Rezultati glikemije kod teladi ogleadne grupe ukazuju da hormonalna disfunkcija u prenatalnom i ranom neonatalnom periodu doprinosi nemogućnosti sazrevanja mehanizma koja su značajni za održavanje posnatalne homeostaze glukoze. Telad ogleadne grupe rođena su u stanju jako izražene hipoglikemije. Vrednosti glukoze pri rođenju su se smanjile do 2,42 mmol/l, što je bila i najniža vrednost tokom perioda ispitivanja i značajno niža u odnosu na vrednosti glukoze kod kontrolne grupe (3,76 mmol/l). Ovo hipoglikemično stanje kod teladi može se tumačiti kao rezultat izostanka potpunog sazrevanja mehanizama za endogenu produkciju glukoze, t.j. stanja u kome izostaju mehanizmi adaptacije, neophodni za obezbeđenje optimalnog energetskog statusa. Niske vrednosti glikemije u prvim satima nakon rođenja (pre uzimanja kolostruma) su jasan znak nedostatka deponovanog glikogena, koji je osnovni izvor glukoze u tom periodu. U ogleadnoj grupi teladi vrednosti glikemije su tokom celog perioda ispitivanja bile niže u odnosu na kontrolnu, i pored toga što se zapaža trend njenog porasta, što ukazuje da pravovremeni unos kolostruma dovodi do porasta glikemije i uspostavljanja mehanizama njenog održavanja. Međutim, imajući na umu da u fiziološkim uslovima kolostrum ne obezbeđuje optimalni nivo glikemije i da je glukoneogeneza bitan mehanizam u održavanje homeostaze glukoze u neonatalnom periodu (Hammon i sar., 2012), može se zaključiti da je kod teladi ogleadne grupe nizak nivo glikemije rezultat nezrelosti onih procesa u prenatalnom periodu koji omogućavaju endogenu produkciju glukoze u periodu nakon rođanja. Forhead i saradnici (2009) u svojim istraživanjima na fetusu ovce navode da kortizol i tireoidni hormoni utiču na maturaciju enzimskih sistema endogene produkcije glukoze, deponovanje glikogena i mehanizam glukoneogeneze. Isti autori navode da tireoidni hormoni svoj efekat ostvaruju direktnim i indirektnim mehanizmom (Forhead i sar., 2003), i to tako što utiču na razvoj jetre tokom fetalnog perioda a time i na razvoj njenih enzimskih sistema, intenzivirajući metaboličke procese i potrošnju kiseonika, kao i direktno, utičući na ekspresiju gena za enzime glukoneogeneze i njihovu kasniju aktivnost.

Poznato je da visoke koncentracije kortizola na rođenju imaju značajan uticaj na maturaciju endogene produkcije glukoze, a time i na održavanje optimalne glikemije u postnatalnom periodu. U ovom istraživanju, visoka kortizolemija kod teladi ogleadne

grupe u periodu ispitivanja je praćena niskom glikemijom, što je u skladu sa literaturnim navodima da postoji pozitivna interakcija maturacionih efektata kortizola i tireoidnih hormona. Fowden i saradnici (2001) navode da hipotireozno stanje u poslednjoj fazi fetalnog perioda dovodi do izostanka pozitivne korelacije između koncentracije kortizola i aktivnost enzima glukoneogeneze, glukoze-6-fosfataze (G6Paza) i fosfoenolpiruvat karboksilaze (PEPCK) u jetri. Forhead i saradnici (2003) su utvrdili da T_3 povećava aktivnost ovih enzima kod eutireoidnih fetusa ovce u uslovima niske koncentracije kortizola. Niske koncentracije glukoze praćene sa niskim koncentracijama tireoidnih hormona i niskim odnosom T_3 i T_4 , utvrdili su i Steinf-Wagner i saradnici (2011), koji su ukazali na nedostatak maturacionog procesa kod prevremeno rođenih teladi.

Niske koncentracije glukoze prate niske koncentracije insulina posebno u prvim danima nakon rođenja. Međutim, analizom koncentracija insulina i glukoze, može se videti da povećanje insulina četvrtog dana od početka ispitivanja, kada su vrednosti insulina u eksperimentalnoj grupi veće u odnosu na kontrolnu grupu, dolazi do povećanja koncentracije glukoze koja dostiže maksimalne vrednosti takođe četvrtog dana. Ovi nalazi bi se mogli objasniti time da je visoka koncentracija kortizola dovela do smanjnje perifernog iskorišćavanje glukoze i povećanja insulinske rezistentncije čime se održava nivo glukoze u krvi (Hammon i sar., 2003; Scheuer i sar., 2006) . Sa druge strane maksimalne koncentracije glukoze četvrtog dana prate i maksimalne vrednosti T_3 koje su bile značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu. Ovaj nalaz bi se mogao tumačiti kao aktivacija enzima glukoneogeneze u tkivu jetre pod uticajem T_3 i aktivacijom procesa endogene produkcije glukoze koja, uz glukoze poreklom iz kolostruma, omogućava obezbeđivanje optimalne koncentracije glukoze što se može videti sedmog dana života kada su vrednosti glikemije u ogleđnoj grupi približno iste kao vrednosti glikemije kod kontrolne grupe.

6.3. Uticaj prenatalnog tretmana sa PTU na IGF sistem teladi

Uticaj primenjenog prenatalnog tretmana sa PTU na IGF sistem neonatalne teladi u ovom istraživanju procenjivan je na osnovu koncentracija IGF-1 i IGF-vezujućih proteina (IGFBP-2 i IGFBP-3), što je u skladu sa metodologijom koju su koristili drugi istraživači (Skaar i sar., 1994 ; Blum i Hammon, 1999 ; Kirovski i sar, 2011). Ovi

autori u svojim radovima ukazuju da je tokom neonatalnog perioda, IGF sistem i aktivnost somatotropne osovine primarno zavisna od energetskog statusa jedinke, pri čemu naglašavaju da je somatotropna osovina tokom ranog neonatalnog perioda funkcionalna, ali sa niskim stepenom sazrevanja.

Većina literaturnih izvora ukazuje da na rani postnatalni razvoj i funkcionisanje somatotropne osovine primarno utiče unos optimalne količine kolostruma, koji direktno doprinosi uspostavljanju pozitivnog energetskog statusa jedinke putem unosa značajne količine energije, a istovremeno deluje i posredno, tako što kolostralni IGF-1 kao faktor rasta potpomaže razvoj i sazrevanje ćelija digestivnog trakta, posebno crevnog epitela (Blum i Hammon 2000; Georgiev, 2008).

U ovom istraživanju, vrednosti koncentracije IGF-1 kod teladi ogledne grupe bile su značajno niže u odnosu na vrednosti ustanovljene kod teladi kontrolne grupe od dana teljenja do sedmog dana neonatalnog života, kada su se izjednačile. Imajući u vidu da su obe grupe teladi napajane odgovarajućim količinama kolostruma u preporučeno vreme u odnosu na samo teljenje, te da u tom pogledu nisu postojale razlike između teladi ogledne i kontrolne grupe, može se reći da razlike koje su ustanovljene u vrednostima koncentracija IGF-1 i uopšte aktivnosti somatotropne osovine nisu bile u vezi sa unetom količinom i vremenom unosa kolostruma.

Sparks i saradnici (2003) navode da je resorpcija kolostralnog IGF-1 i IGFBP-3 moguća u prvih 24 sata nakon rođenja, a time i njen uticaj na promenu koncentracije ovih molekula u neonatalnom periodu, a polazeći od činjenice o propustljivosti intestinalne mukoze u prvih 48 sati nakon rođenja (Gardner i sar., 1984). Podaci dobijeni od strane ovih autora mogu biti i objašnjenje za blago povećanje koncentracije IGF-1 kod ogledne grupe tokom prva dva dana neonatalnog života u odnosu na vrednosti na dan teljenja, pri čemu treba imati u vidu da se značajan deo kolostralnog IGF-1 ne resorbuje u krv, već ga preuzimaju ćelije samog digestivnog trakta u kojima služi kao lokalni faktor rasta. U prilog ovome je i činjenica da je koncentracija IGF-1 veća u prvim danima kolostralnog perioda, a zatim opada sa napredovanjem laktacije (Rauprich i sar., 2000). Basset i saradnici (1990) ukazuju da je poluživot IGF-1 kod preživara u cirkulaciji veoma kratak u slobodnom obliku (oko 12 minuta) dok se u vezanom obliku, nakon vezivanja za proteine nosače, značajno produžuje, i to na 12 do 15 sati.

Da je energetska status značajan za održavanje optimalne koncentracije IGF-1 tokom ranog neonatalnog perioda ukazuju i Brameld i saradnici (1999) i Butler i saradnici (2003), koji navode da povećane koncentracije glukoze i insulina u cirkulaciji stimulišu endogenu produkciju IGF-1. U skladu sa ovim nalazom su i rezultati do kojih su došli Kirovski i saradnici (2011), koji su kod neonatalne teladi ustanovili pozitivnu korelaciju između koncentracija insulina i IGF-1, što je i očekivan rezultat, s obzirom na činjenicu da su oba ova hormona indikatori energetske statusa jedinke. Kirovski i saradnici (2008) utvrdili su da su teladi koja su primila glukozu u prvih 30 minuta nakon rođenja održavala stabilne koncentracije IGF-1, što ukazuje da pored nutritivnog statusa jedinke postoje i drugi faktori koji utiču na kretanje koncentracije IGF-1 u krvi. Metabolički status jedinke se, pored unosa hrane, odnosno nutritivnog statusa, nalazi pod direktnom kontrolom endokrinog sistema, pri čemu poseban značaj imaju hormoni tireoidne osovine za koje je poznato da direktno utiču na intenzitet metaboličkih procesa u organizmu. Uticaj tireoidnih hormona na rast može biti indirektan, kroz efekat na indikatore energetske statusa jedinke, ili direktan kroz uticaj na komponente somatotropne osovine. Ramos i saradnici (1998) su utvrdili da je hipotireozno stanje kod pacova dovelo do pada periferne koncentracije insulina i koncentracije IGF-1, dok su na nivou jetre utvrdili pad ekspresije mRNA za IGF-1, čime su ukazali na pozitivnu korelaciju između insulina i IGF-1. Fowden i saradnici (2006) navode da je pad koncentracija IGF-1 takođe rezultat sniženja ekspresije gena za IGF-1 u tkivu jetre, koje sintetiše IGF-1 za potrebe sistemske cirkulacije. Potencijalno objašnjenje za smanjenu koncentraciju IGF-1 u krvi ogleadne grupe teladi je i posredno smanjenje njegove sinteze zbog toga što je intenzitet metaboličkih procesa prenatalno bio smanjen zbog indukcije hipotireoze, koja je njihov organizam dovela u stanje funkcionisanja na nižem energetske statusu, zbog čega je i potreba organizma za IGF-1 bila manja u odnosu na telad kontrolne grupe. Nakon teljenja, značajan deo molekula IGF-1 poreklom iz kolostruma je bio zadržan u samom zidu creva, sa ciljem da se potencira lokalni metabolizam i omogući umnožavanje crevnog epitela (Bühler i sar., 1998; Roffler i sar., 2003), te nije dospelo u sistemska cirkulacija, što je bilo izraženije kod ogleadne grupe teladi. Tome svakako treba pridodati i činjenicu da su telad napajana kolostrumom (i kasnije mlekom) svojih majki, pri čemu je kolostrum majki tretiranih sa PTU kao rezultat tretmana verovatno sadržao i nešto manju koncentraciju IGF-1 u odnosu na

kolostrum netretiranih majki, što se odrazilo i na njegov transfer kod teladi. Ipak, važno je naglasiti da se iskorištavanje kolostralnih IGF-1 kod obe grupe teladi odvijalo istom dinamikom od dana teljenja do kraja ispitivanog perioda, na šta ukazuje identičan trend kretanja njegove koncentracije.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na niske koncentracije IGF-1, koje su praćene niskim koncentracijama insulina na dan teljenja i prvog dana neonatalnog života. Znajući da je insulin dominantni regulator sinteze i sekrecije IGF-1, moglo bi se očekivati da su niske koncentracije IGF-1 u prvim danima života rezultat niske koncentracije insulina ili da je je hipotireozno stanje dovelo do inhibicija sinteze i sekrecije IGF-1 posredno, kroz inhibični efekat niske koncentracije insulina. Naši rezultati za promenu koncentracije IGF-1 tokom ispitivanog perioda kod ogleadne grupe teladi su u saglasnosti sa navodima autora koji su ustanovili da je hipotireoza u neonatalnom periodu praćena niskim koncentracijama IGF-1 (Santana-Farre' i sar., 2012).

Stanje i aktivnost somatotropne osovine mogu se analizirati i kroz zastupljenost IGFBP-3, koji u fiziološkim uslovima vezuje više od 75% cirkulišućeg IGF-1 i time reguliše njegovu efektivnu koncentraciju u serumu, dostupnost tkivima i biološku aktivnost (Kostecka i sar., 2002). U ovom radu zastupljenost IGFBP-3 u ogleadnoj grupi je konstantno značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati IGFBP-3 u kontrolnoj grupi ukazuju na dominantnu zastupljenost u odnosu na IGFBP-2 što je u saglasnosti sa rezultatima ostalih autora (Skaar i sar., 1994; Kirovski i sar., 2011). Niske vrednosti IGFBP-3, takođe prate niske koncentracije IGF-1 tokom celog perioda istraživanja. Povećanje koncentracije može se primetiti tek sedmog dana kada su vrednosti približne vrednostima kontrolne grupe.

Pad koncentracije IGFBP-3 omogućava veći klirens molekula IGF-1 uz veću tkivnu dostupnost što dovodi do pada serumske koncentracije IGF-1. Pad koncentracije IGF-1 uz pad relativne zastupljenosti IGFBP-3 kod novorođene teladi je karakterističan za prve sate nakon rađanja i traje do prvog napoja kolostruma pri čemu Kirovski i saradnici (2011) ukazuju da je zastupljenost IGFBP-3 zavisna od procesa sinteze koja je regulisana glukozom, s obzirom da u uslovima niske glikemije dolazi do procesa proteolitičke razgradnje molekula IGFBP-3. Istraživanja ukazuju da proteolitička razgradnja molekula IGFBP-3 može biti regulisana energetskim potrebama. IGFBP-3

smanjuje periferno iskorišćavanje glukoze uz smanjenje periferne senzitivnosti tkiva na glukozu i dovodi do povećanja insulinske rezistencije (Yamada i Lee, 2009). Prema tome moglo bi se reći da je energetska status u neonatalnom periodu značajan faktor zastupljenosti IGFBP-3 na što ukazuju i Hammon i saradnici (2000). Značajno niža relativna zastupljenost IGFBP-3 u odnosu na kontrolnu grupu u našem radu moglo bi se smatrati posledicom energetske deficita i niske koncentracije glukoze u prvim danima nakon rađanja kod teladi ogledne grupe. Istraživanje koje su sproveli Rodriguez-Arno i saradnici (1994) na pacovima sa indukovanom hipotireozom, ukazalo je na nisku ekspresiju mRNA IGFBP-3 kod ovih jedinki. Kasnije su slične rezultate dobili su i Ramos i saradnici (2001), koji navode da IGF vezujući proteini tokom neonatalnog perioda pokazuju veću osetljivost na tireoidne hormone. Naime isti autori su, istraživanjem na tireoidektomisanim pacovima tokom neonatalnog perioda utvrdili da egzogeno aplikovan T_4 dovodi do povećanje zastupljenosti mRNA IGFBP-3 u jetri i povećanja serumske zastupljenosti IGFBP-3 do vrednosti koje su utvrđene kod kontrolne grupe, čime ukazuju na ulogu tireoidnih hormona u regulaciji IGFBP-3. Navodi ovih autora mogu biti dodatno objašnjenje niske vrednosti IGFBP-3 kod teladi u oglednoj grupi.

IGFBP-2 je dominantni IGF-vezujući protein tokom fetalnog perioda i njegova relativna zastupljenost je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom IGF-II u krvi. Njegova primarna uloga je da inhibira oslobađanje IGF-1, odnosno da ga drži vezanog za sebe, smanjujući mu tako koncentraciju u sistemskoj cirkulaciji i predstavljajući njegov depo. Tokom postnatalnog perioda i kod životinja u rastu, njegova relativna zastupljenost opada, što se objašnjava kao mehanizam koji omogućava ispoljavanje biološke aktivnosti IGF-I, odnosno stimuliše rast (Rausch i sar., 2002). Novija istraživanja navode da je IGFBP-2 pouzdan indikator nutritivnog statusa u ranom postnatalnom periodu (Lo i sar., 2005; Smerieri i sar., 2011). Relativna zastupljenost IGFBP-2 u krvi kontrolne grupe teladi, ustanovljena u ovom istraživanju, u saglasnosti je sa vrednostima koje navode Skaar i saradnici (1994) i Govoni i saradnici (2004). Zastupljenost IGFBP-2 u krvi ogledne grupe teladi tokom celog perioda istraživanja bila je značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu, dok se unutar grupe nije značajnije menjala tokom ispitivanog perioda. Sedmog dana, relativna zastupljenost IGFBP-2 u krvi kontrolne grupe teladi opala je do približno iste vrednosti koju je imala ogledna

grupa, što ukazuje da se i kod teladi ogledne grupe do tog vremena uspostavila ravnoteža u relativnoj zastupljenosti pojedinih tipova IGFBP. U ovom istraživanju je ustanovljeno da relativnu zastupljenost IGFBP-2, ustanovljene kod teladi ogledne grupe, prate i niske vrednosti glikemije, što nije u skladu sa rezultatima drugih autora. Naime, niska relativna zastupljenost IGFBP-2 povezuju se sa pozitivnim energetske statusom životinje, dok visoka zastupljenost IGFBP-2 ukazuje na dominaciju kataboličkih procesa u organizmu (Breier i sar., 2000). Napajanje zamenom mleka, gladovanje ili nepravovremeno napajanje kolostrumom potencira kataboličke procese u organizmu, a sa njima i visoku relativnu zastupljenost IGFBP-2 i sniženje odnosa IGFBP-3/IGFBP-2 (Hammon i sar., 2000). Novija istraživanja na pacovima ukazuju da IGFBP-2 svoj uticaj na energetske status jedinke ostvaruje kroz inhibiciju ekspresije gena za enzime glukoneogeneze u tkivu jetre, smanjujući na taj način nivo glukoze u krvi i povećavajući insulinsku osetljivost (Hedbacker i sar., 2010). Prilikom tumačenja odnosa relativne zastupljenosti IGFBP-2 i energetske statusa jedinke, važno je napomenuti da se kod preživara IGFBP-2 nalazi u negativnom odnosu sa insulinom, što je suprotno u odnosu na ljude (McGurie i sar., 1995; Arafat i sar., 2009). Istraživanja u in vitro uslovima ukazuju na inhibitorski efekat insulina na ekspresiju mRNA za IGFBP-2 u ćelijama jetre (Böni-Schnetzler i sar., 1990; Demori i sar., 1999). Ramos i saradnici (2002) utvrdili su povezanost povećane zastupljenosti IGFBP-2 kod neonatalnih pacova sa niskom koncentracijom insulina, pri čemu su ukazali na osetljivost ekspresije mRNA za IGFBP-2 u jetri pacova na promene u koncentraciji insulina. Kirovski i saradnici (2011) su utvrdili blagi (ali ne i statistički značajan) porast zastupljenosti IGFBP-2 kod neonatalne teladi nakon prvog napoja kolostrumom što bi se moglo objasniti resorpcijom jednog dela IGF i vezujućih proteina koji onda dospevaju u krv. Rezultati ovih radova ukazuju da niska relativna zastupljenost IGFBP-2 koje smo utvrdili u krvi ogledne grupe teladi mogu biti rezultat smanjene sintetske aktivnosti ćelija jetre, uzrokovane indukcijom hipotireoze.

Tireoidni hormoni pokazuju specifičan mehanizam delovanja na ekspresiju i zastupljenost IGFBP-2. Näntö-Salonen i saradnici (1991), a kasnije i Ramos i saradnici (2001) su utvrdili održavanje visoke zastupljenosti IGFBP-2 kod pacova sa neonatalnim hipotireoidizmom, što govori u prilog ranijem zaključku da je povećanje relativne zastupljenosti IGFBP-2 jedan od mehanizama koji omogućava štednju energije u

uslovima funkcionisanja na nižem energetsom nivou, a istovremeno potvrđuje i pretpostavku da hipotireoza ima za rezultat smanjenje sintetske aktivnosti jetre uopšte, pa tako i u pogledu sinteze IGFBP-2. Sa druge strane Demori i saradnici (1999) u in vitro uslovima ukazuju na direktan stimulatívni efekat tireoidnih hormona na ekspresiju mRNA za IGFBP-2 u ćelijama jetre, što govori da u in vivo uslovima verovatno postoje dodatni faktori koji regulišu sintezu i relativnu zastupljenost IGFBP-2. Isti autori ukazuju na dominantnu ulogu insulina u regulaciji sinteze IGFBP-2 u situacijama promene tireoidnog statusa (Demori i sar., 1999).

Niske vrednosti relativne zastupljenosti IGFBP-2 u krvi ogleđne grupe teladi, praćene su znaćajno višim koncentracijama kortizola, što nije u skladu sa navodima drugih autora. Visoke koncentracije kortizola su rezultat stimulacije adrenokortikalne osovine i predstavljaju jasan indikator stresnog stanja, karakteristićnan za period rađanja (Jacob i sar., 2001). Nikolić i saradnici (2003) povezuju stresno stanje i visoke vrednosti relativne zastupljenosti IGFBP-2, što ponovo mođe ukazivati na potrebu organizma da, u uslovima koji nalađu preusmjeravanje dostupne kolićine energije prema tkivima koja imaju prioritet u datom momentu, uspori rast i razmnožavanje ćelija i tkiva tako što će smanjiti dostupnost IGF. Visoke koncentracije kortizola pri porođaju u fiziološkim uslovima praćene su visokom relativnom zastupljenošću IGFBP-2 (Kirovski i sar., 2011). Međutim, drugi autori (Forhead i sar., 1998; Breier i sar., 2000; Schmidt i sar., 2004) navode da je peripartalno povećanje koncentracije kortizola jedna od ključnih komponenata znaćajnih za maturaciju somatotropne osovine, koja se, između ostalog manifestuje i opadanjem relativne zastupljenosti IGFBP-2 u postnatalnom periodu. Rajaram i saradnici (1997) ukazuju da glukokortikoidi pokazuju supresívni efekat u odnosu na relativnu zastupljenost IGFBP-2. Sauter i saradnici (2003) su ustanovili da je aplikacija deksametazona kod neonatalne teladi dovela do pada relativne zastupljenosti IGFBP-2, ali ne i supresije ekspresije mRNA za IGFBP-2 u ćelijama jetre, kao i povišenje koncentracije IGF-1 u krvi, najverovatnije kao rezultat njegovog pojaćanog oslobađanja sa molekula vezujućih proteina.

Imajući u vidu sve navedeno, mođe se reći da je, kao rezultat indukcije hipotireoze tokom prepartalnog perioda, organizam teladi ogleđne grupe funkcionisao na energetske nižem nivou, što se (najverovatnije preko smanjene sintetske sposobnosti jetre) odrazilo na koncentracije IGF-1, te relativnu zastupljenost IGF-vezujućih

proteina, koja je potencirala štednju energije i usporavanje anaboličkih procesa u prvim danima neonatalnog života.

6.4. Uticaj prenatalnog tretmana sa PTU na proteinski status neonatalne teladi

Koncentracija ukupnih proteina u krvi obe grupe teladi na dan teljenja bila je niža u odnosu na sve kasnije vrednosti, što govori u prilog literaturnim navodima da telad dolaze na svet sa koncentracijama ukupnih proteina nižim u odnosu na odrasle jединke (Kraft i Dürr, 1999; Kirovski i sar., 2002). Razlog za to je, svakako, fiziološka agamaglobulinemija, koja nastaje kao posledica nemogućnosti prolaska imunoglobulina kroz placentu, zbog čega se koncentracija globulina, a sa njima i ukupnih proteina naglo povećava nakon unosa kolostruma (Herosimczyk i sar., 2011; Quezada-Tristán i sar., 2014). Vrednosti koncentracije ukupnih proteina na dan teljenja (pre uzimanja kolostruma), kao i trend njenih promena tokom perioda istraživanja kod kontrolne grupe bile su u saglasnosti sa vrednostima koje navode Kirovski i saradnici (2002) i Ježek i saradnici (2006). Kod ogleđne grupe teladi došlo je do blagog povećanja koncentracije ukupnih proteina, koje uglavnom nije bilo statistički značajno u odnosu na inicijalne vrednosti. Porast koncentracije ukupnih proteina u krvi teladi je rezultat unosa kolostruma i resorpcije njegovih proteina, te se koncentracija ukupnih proteina može smatrati indirektnim indikatorom adekvatnosti napajanja kolostrumom (Tyler i sar., 1998; Ježek i sar., 2006; Herosimczyk i sar., 2011). Porast koncentracije proteina u prvih 24 sata neonatalnog života rezultat je povećane intestinalne propustljivosti, posebno za imunoglobuline. Prema tome, porast ukupnih proteina u ranom neonatalnom periodu rezultat je dominantne resorpcije imunoglobulina kolostruma (Hammon i sar., 2002; Kirovski i sar., 2002). Kod obe grupe se može zapaziti da postoji pozitivna korelacija između vremena i količine napoja kolostrumom i koncentracije ukupnih proteina.

Rezultati za koncentraciju albumina u krvi teladi pokazuju da tokom ispitivanog perioda uglavnom ne postoje statistički značajne razlike između ogleđne i kontrolne grupe. Vrednosti koncentracije albumina u momentu rođenja kod obe grupe teladi bile su ispod referentnih vrednosti za odrasle jединke (30,30-35,50g/l prema Kaneko i sar., 2008), što je u saglasnosti i sa podacima koje navode Knowels i saradnici (2000) i Ježek i saradnici (2006). Isti autori navode da telad dosežu referentne vrednosti koncentracije

albumina sa oko 10 dana starosti. U ovom istraživanju koncentracija albumina u krvi ogledne grupe teladi bila je ispod donje granice referentnog intervala tokom celog ispitivanog perioda, dok su vrednosti ustanovljene kod teladi kontrolne grupe dostigle referentne vrednosti krajem ispitivanog perioda, što je u skladu sa literaturnim navodima o vremenu izjednačavanja koncentracije albumina kod teladi sa referentnim vrednostima za goveda uopšte. Poređenjem sa koncentracijama globulina, uočljivo je da su se telad rađala sa većom koncentracijom albumina u odnosu na globuline, i takav odnos između albumina i globulina je bio prisutan sve do prvog napoja kolostrumom. Visoke vrednosti albuminsko/globulinskog odnosa kod jagnjadi na rođenju utvrdili su i Nagi i saradnici (2014). Nakon uzimanja kolostruma karakterističan je rast koncentracije globulina u odnosu na albumine, kada se njihov odnos menja u korist globulina, što su potvrdili i Tóthová i saradnici (2014) kod teladi tokom prve nedelje neonatalnog života. Koncentracija albumina kod kontrolne grupe teladi imala je generalno stabilan trend postepenog porasta od dana teljenja do kraja ispitivanog perioda, što ukazuje na povećanje sintetske aktivnosti jetre. Ovaj nalaz je u saglasnost sa navodima Nussbaum i saradnika (2002) koji ukazuju da je povećanje koncentracija proteina u krvi novorođene teladi tokom prve nedelje života rezultat povećane sinteze albumina u jetri. Nasuprot tome, kod teladi ogledne grupe je izostao porast koncentracije albumina i došlo je do njenog postepenog opadanja prema kraju ispitivanog perioda, što su Quigely i saradnici (2002) objasnili pojačanim katabolizmom proteina i iskorištavanjem aminokiselina u procesima glukoneogeneze. Tome svakako doprinosi i porast koncentracije T_3 u krvi ogledne grupe teladi, kao indikator povećanja intenziteta bazalnog metabolizma, odnosno pojačane potrebe u energiji i potrošnje glukoze, a posredno i intenziviranja glukoneogenetskih procesa. U prilog ovome je i podatak da proteini u neonatalnom periodu imaju značajnu ulogu u održavanju energetske homeostaze, odnosno da albumini u situaciji povećanih energetske potreba i potreba za aminokiselinama kao gradivnim supstratom, snabdevaju organizam dovoljnim koncentracijama aminokiselina (Herosimczyk i sar., 2011; Van der Akker i sar., 2007).

Unos kolostruma doveo je značajnog povećanja koncentracije globulina u krvi teladi obe grupe, pri čemu su one kod teladi ogledne grupe bile značajno niže u odnosu na kontrolnu. Ovakav trend može da ukaže na slabiji stepen iskorištavanja globulina iz

kolostruma, prvenstveno imunoglobulina, kod teladi ogleadne grupe, i to najverovatnije kao posledica nedovoljnog sazrevanja njihovog crevnog epitela, što je smanjilo i iskorištavanje IGF-1. Imajući u vidu niske koncentracije tireoidnih hormona, insulina i glukoze u krvi teladi ogleadne grupe u prvim danima ispitivanog perioda, za očekivati je i da je generalni anabolički efekat svih navedenih faktora (kao i drugih faktora rasta poreklom iz kolostruma) kod ogleadne grupe teladi bio slabije izražen u odnosu na kontrolnu grupu. Većina radova koji opisuju efikasnost transfera imunoglobulina kod teladi se odnosi na transfer IgG, kao glavnih imunoglobulina kolostruma (Stilwell i sar., 2011; Villaruel i sar., 2013; Abd El-Fattah i sar., 2012). Utvrđena je i pozitivna korelacija između koncentracije globulina i koncentracije IgG u serumu novorođene teladi nakon uzimanja kolostruma u prvih 24 sata života (Thaís i sar., 2012). Matte i saradnici (1982) navode da unos kolostruma u prvih šest sati nakon rođenja omogućava resorpciju 65,8% od ukupne koncentracije IgG unete kolostrumom. Isti autori utvrdili su da taj procenat naglo opada do vrednosti od 6% 48. sata nakon rođenja, ukazujući na značaj pravovremenog unosa kolostruma. U prilog ovome je i činjenica da promene gastrointestinalnog sistema u neonatalnom periodu smanjuju mogućnost resorpcije imunoglobulina, dok koncentracija imunoglobulina u kolostrumu kontinuirano opada tokom vremena od teljenja (Pácha i sar., 2000). Imajući u vidu činjenicu da su telad obe grupe pravovremeno unela dovoljne količine kolostruma, faktor vremena unosa kolostruma se ne može uzeti kao uzrok niže koncentracije globulina kod teladi ogleadne grupe. Koncentracije imunoglobulina rastu tokom perioda ispitivanja i trend kretanja prati trend kretanja kod kontrolne grupe, što ukazuje da kod ogleadne grupe ipak postoji transfer imunoglobulina ali je verovatno efikasnost i kapacitet resorpcije manji u odnosu na kontrolnu grupu.

S obzirom na to da su majke teladi ogleadne grupe tretirane sa PTU tokom završne faze graviditeta, odnosno u periodu kada se mlečna žlezda priprema za porođaj i inicijaciju laktacije, logična pretpostavka je da je tretman uticao i na količinu sintetisanih imunoglobulina i njihov transfer iz krvi u mlečnu žlezdu, što je takođe potencijalni razlog za slabiji transfer kolostralnog imuniteta kod teladi ogleadne grupe. Isto tako, s obzirom da je tretman majki sa PTU trajao do samog dana teljenja, za očekivati je da se (u skladu sa literaturnim podacima o transferu PTU u mleko kod ljudi) određena količina PTU nađe i u kolostrumu, odnosno mleku, što bi moglo da utiče i na

telad koja ih unose. Prema našim saznanjima, veoma je mali broj istraživanja koje se odnose na uticaj PTU na sastav kolostruma ili mleka kod krava. Ranija istraživanja koje su sprovedli Chanda i saradnici (1951), analizirajući sastav mleka kod krava koja su bile tretirana tiouracilom, su pokazala da tiouracil ne utiče na proteine mleka.

Značajan faktor koji utiče na efikasnost resorpcije imunoglobulina i ostalih značajnih makromolekula kolostruma je i sazrevanje intestinalnog epitela, koje je regulisano perinatalnim koncentracijama kortizola, koji stimuliše makromolekularni transport kroz intestinalnu barijeru. Međutim, Stott i saradnici (1980) su utvrdili da tretman teladi sa kortikosteroidima ili indukcija sekrecije hormona nadbubrega ne dovodi do povećanja resorpcije imunoglobulina, iz čega su izveli zaključak da je značaj kortizola u maturaciji resorpcione sposobnosti crevnog epitela u prenatalnom periodu. U prilog ovome je i istraživanje koje je pokazalo da tretman sa ACTH dovodi do blagog povećanja kapaciteta resorpcije imunoglobulina kod prevremeno rođene jagnjadi (Hough i sar., 1990). Prevremeno rođene jedinke imaju manji kapacitet resorpcije makromolekula, što se može pripisati nivou maturacije intestinalnog epitela, ali takođe i endokrinim i metaboličkim promenama karakterističnim za prevremeno rođene jedinke, koje onemogućavaju maksimalno ispoljavanje funkcionalnog kapaciteta enterocita u odnosu na mehanizme resorpcije makromolekula. Cabello i Levieux (1981) su kod novorođene jagnjadi utvrdili negativnu korelaciju između koncentracija imunoglobulina i kortizola u prvim satima nakon rođenja, i ukazali da je moguće da kortizol smanjuje resorpciju IgG u prvim satima nakon rođenja. Sanglid (2003) objašnjava mogućnost pozitivnog i negativnog efekta visoke koncentracije kortizola na efikasnost i kapacitet resorpcije imunoglobulina kod novorođene teladi. Prema navodima ovog autora, jak stres uz visoke koncentracije kortizola kod teladi rođene nakon optimalnog trajanja graviditeta, direktno je vezan za distocije ili metaboličke i endokrine promene kod teladi na rođanju (hipooksija, acidoza, hipoglikemija, visoke koncentracije adrenalina) i može da smanji kapacitet resorpcije imunoglobulina. Istraživanja na pacovima tokom ranog neonatalnog perioda ukazuju da visoke koncentracije kortizola nakon rođenja smanjuju kapacitet vezivanja IgG usled inhibicije ekspresije Fc receptora na intestinalnom epitelu (Gill i sar., 1999). Isti autori su takođe utvrdili slične efekte i nakon davanja visokih koncentracija tiroksina. Cabello i saradnici (1978; 1980) i Slobodziński i saradnici (1995) ukazuju na negativni efekat T₄ na resorpciju imunoglobulina. Cabello i saradnici

(1981) navode da T_4 stimuliše ćelijsku zamenu unutar intestinalnog epitela, dok T_3 pozitivno utiče na proces resorpcije u prvim satima nakon rođenja. U prilog tome su i navodi da tireoidni hormoni direktno utiču na razvoj i maturaciju enterocita, dok inaktivacija receptora za tireoidne hormone usporava proces intestinalne maturacije (Pácha i sar., 2000). Po svemu sudeći, niže koncentracije globulina (odnosno najvećim delom imunoglobulina) kod ogleadne teladi su verovatno rezultat endokrinih i metaboličkih promena uz nizak energetska bilans (niska glikemija, niske vrednosti insulina, vrednosti tireoidnih hormona i IGF sistem), kao i visokog stepena stresa koji se ogleda kroz visoke koncentracije kortizola, a koji je doveo do smanjenja kapaciteta i efikasnosti resorpcije imunoglobulina. Sanglid (2003) navodi da nutritivni i energetska deficit fetusa tokom poslednje faze graviditeta može da smanji intestinalni kapacitet iskorišćavanja imunoglobulina u postnatalnom periodu, što je uzrok većeg procenta smrtnosti teladi u neonatalnom periodu. Međutim, ovi navodi nisu u skladu sa istraživanjima koja su pokazala da novorođene životinje sa zastojem u rastu imaju veći kapacitet intestinalne absorpcije makromolekula (Svendsen i sar., 1990; Jensen i sar., 2001).

6.5. Uticaj prenatalnog tretmana sa PTU na lipidni status neonatalne teladi

Kolostrum je značajan izvor lipida, koji se resorbuju u digestivnom traktu neonatalne teladi, nakon čega dolazi do povišenja koncentracije holesterola i triglicerida u krvi (Hammon i Blum, 1998), sa ciljem obezbeđenja dovoljnih količina energije i povoljnog energetskog bilansa (Blum i Hammon, 2000). O značaju kolostruma kao izvora lipida za novorođene jedinke govore i rezultati istraživanja koje su sproveli Pethick i saradnici (1993), koji su ustanovili da oko 60% od ukupnih slobodnih masnih kiselina u krvi preživara potiče iz procesa hidrolize triglicerida uz pomoć enzima lipoprotein-lipaze (LPL). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju navode pomenutih autora, jer je kod obe grupe teladi ustanovljen porast koncentracije triglicerida i holesterola nakon uzimanja kolostruma, da bi tokom ostatka ispitivanog perioda obe grupe teladi imale isti trend kretanja ova dva parametra. Koncentracije triglicerida u krvi teladi ogleadne grupe bile su više u odnosu na kontrolnu tokom celog ispitivanog perioda, dok je kod koncentracije holesterola ustanovljen suprotan trend. Nalaz

koncentracije triglicerida kod teladi kontrolne grupe u saglasnosti je sa navodima drugih autora (Hammon i Blum, 1998; Jankowiak i sar., 2010; Herosimczyk i sar., 2013).

Visoke koncentracije triglicerida u krvi teladi (ogledne grupe na dan teljenja prije uzimanja kolostruma) ukazuju na smanjenu aktivnost LPL tokom perioda prenatalne hipotireoze, jer je dokazano da niske koncentracije tireoidnih hormona (posebno T_3) smanjuju aktivnost LPL (Jin i Teng 2014). Potvrdu ovih navoda daju i autori koji su ustanovili da je hipotireozno stanje praćeno pojavom sekundarne dislipidemije i povišenjem koncentracije triglicerida (Ibrahim i sar. 1984 ; Ćelik i sar 2000). Postepeni porast koncentracije triglicerida u krvi ogledne grupe teladi tokom ispitivanog perioda ukazuje na efikasnu resorpciju triglicerida iz kolostruma, kao i prolongirani efekat niskih koncentracija tireoidnih hormona na aktivnost LPL, koji polako slabi sa njihovim povišenjem, što se vidi i kroz kretanje koncentracije triglicerida koja od petog dana nakon teljenja polako opada prema kraju ispitivanog perioda.

Stanko i saradnici (1991) navode da povišenje koncentracije triglicerida u krvi može biti indikator njihovog pojačanog iskorištavanja za energetske potrebe organizma, iako nisu utvrdili korelaciju između delovanja niskih temperatura kao izvora stresa i povišenja koncentracije triglicerida.

Gronget (1984) navodi da je hipoksija tokom ranog neonatalnog perioda kod jagnjadi praćena povišenjem koncentracije triglicerida, što tumače smanjenom oksidacijom slobodnih masnih kiselina i smanjenim iskorištavanjem triglicerida u perifernim tkivima, zbog čega dolazi do njihove reesterifikacije. Imajući u vidu da hipotireozno stanje ima za posledicu i smanjenje utilizacije kiseonika u tkivima, odnosno smanjenu oksidativnu aktivnost, za očekivati je da će kod jedinki u hipotireoznom stanju koncentracija triglicerida biti povišena, što je verovatno slučaj i u ovom istraživanju.

Uticaj glukokortikosteroida na koncentraciju triglicerida je specifičan po tome da oni povećavaju aktivnost LPL i smanjuju perifernu koncentraciju triglicerida, potencirajući iskorištavanje slobodnih masnih kiselina u tkivima za njihove energetske potrebe (Peckett i sar., 2011 ; Kusenda i sar., 2013). Istraživanja ukazuju da svoj stimulatívni efekat na aktivnost LPL, glukokortikoidi ostvaruju u prisustvo insulina (Ottoson i sar., 1994). Insulin je antilipolitički i anabolički hormon, koji pozitivno utiče na gensku regulaciju sinteze i aktivnosti LPL, čime stimuliše katabolizam lipoproteina

koji sadrže trigliceride, što bi u slučaju ogledne grupe teladi mogao biti uzrok održavanja visokih koncentracija triglicerida u prvim danima neonatalnog života.

Varijacije vrednosti koncentracije triglicerida u krvi ogledne grupe teladi tokom ispitivanog perioda mogu se dovesti u vezi i sa maturacijom epitela digestivnog trakta i njegovom sposobnošću za resorpciju lipida, jer je poznato da stepen maturacije gastrointestinalnog sistema u velikoj meri utiče i na sposobnost iskorištavanja komponenti kolostruma. Istovremeno, sam stepen maturacije gastrointestinalnog sistema teladi, sekrecija i aktivnost enzima koji učestvuju u iskorištavanju masti uslovljeni su, između ostalog, i unosom kolostruma, odnosno faktora rasta koji se u njemu nalaze.

Blättler i saradnici (2001) utvrdili su veću aktivnost pankreasne lipaze kod teladi napajane kolostrumom u dužem vremenskom periodu nakon teljenja. Sekrecija enzima egzokrinog pankreasa, uključujući i pankreasnu lipazu u vreme teljenja je veoma niska i povećava se tokom prvih 8 dana neonatalnog života (Huber i sar., 1961 ; Guilloteau i sar. 2009), kako bi se omogućilo efikasno iskorištavanje proteina mleka čije je razlaganje počelo delovanjem želudačnog soka. U prilogu ovome je i podatak da koagulirani kazein u abomazusu teladi usporava resorpciju triglicerida za nekoliko sati, obzirom da su koncentracije himozina i pepsin su dovoljne da koagulišu prispele količine kazeina još prvog dana nakon rođenja (Hocquette i Bauchart 1999 ; Guilloteau i sar. 2009 ref103). Takođe je utvrđeno da je intestinalna sinteza hilomikrona i VLDL kod teladi napajane zamenama za mleko spora i svoj maksimum dostiže tek 8 sati nakon napajanja (Durand i sar.,1990). Maturacija mehanizama i enzima koji učestvuju u iskorištavanju masti iz kolostruma i mleka u prvim danima neonatalnog života teladi odvija se dosta brzo, na šta ukazuje i praktično identičan trend kretanja koncentracija triglicerida kod ogledne i kontrolne grupe teladi tokom ispitivanog perioda.

Koncentracije holesterola u krvi teladi obe grupe povećavaju se značajno već drugog dana neonatalnog života, što jasno ukazuje da značajan dio holesterola u krvi neonatalne teladi potiče iz kolostruma. Koncentracije holesterola rastu tokom čitavog perioda ispitivanja u obe grupe, s tim da su kod ogledne grupe teladi sve vreme nešto niže.

Potencijalno objašnjenje za niže koncentracije holesterola u krvi teladi ogledne grupe je njeno smanjena sinteza u tkivu jetre, zbog generalno smanjene sintetske

aktivnosti jetre uzrokovane hipotireoznim stanjem. Tireoidni hormoni regulišu koncentraciju holesterola tako što stimulišu aktivnost HMG-CoA reduktaze, enzima značajnog u sintezi holesterola, ali istovremeno pojačavaju i ekspresiju receptora za lipoproteine niske gustine (LDL), čime potenciraju njegovo preuzimanje u tkivima i katabolizam (Rizos i sar., 2011). U prilog ovome su i nalazi da indukcija hipotireoze dovodi do povišenja koncentracije holesterola usled smanjenja njegovog katabolizma i klirensa holesterola iz cirkulacije (Gupta i sar., 2010). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je indukcija hipotireoze tokom prenatalnog perioda imala za posledicu smanjenje koncentracije holesterola, najverovatnije zbog njegove smanjene sinteze u tkivu jetre, što je u skladu sa podacima koje navode Irmak i saradnici (2004) kod prevremeno rođene teladi. S obzirom da su se niske koncentracije tireoidnih hormona u krvi teladi ogledne grupe održavale i tokom prva dva dana nakon teljenja, za očekivati je da i opisani efekat bude prolongiran, te da sa porastom koncentracije tireoidnih hormona postepeno slabi, što se u ovom istraživanju i dogodilo.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata i njihovog tumačenja izvedeni su sljedeći zaključci:

- Tretman primiparnih majki sa PTU tokom poslednje faze graviditeta izaziva hipotireozu neonatalnih teladi s obzirom da su tokom prvih dana neonatalnog života koncentracije tireoidnih hormona bile statistički značajno niže, a koncentracije TSH značajno više kod teladi poreklom od tretiranih majki u odnosu na telad čije majke nisu bile tretirane sa PTU. Dodatno je, histološkom analizom, kod teladi poreklom od tretiranih majki utvrđena hiperplazija tireoidne žlezde.

- Ekspresija iRNK za sva tri tipa ispitivanih dejodinaza u tkivu placente tretiranih primiparnih majki je bila značajno smanjena u odnosu na netretirane majke, ukazujući da je hipotireoza teladi poreklom od majki tretiranih sa PTU bila uzrokovana ne samo mogućim efektom PTU na aktivnost tireoidne osovine fetusa, već i smanjenim transferom tireoidnih hormona kroz placentu.

- Kod teladi poreklom od tretiranih primiparnih majki utvrđena je kompenzatorna hipertireoza u periodu od 4. do 6. dana neonatalnog života, koja se manifestovala statistički značajno većom koncentracijom tireoidnih hormona tokom 4., 5. i 6. dana neonatalnog života, kao i statistički značajno nižom koncentracijom TSH 5. i 6. dana neonatalnog života u odnosu na telad poreklom od netretiranih primiparnih majki.

- Hipotireoza neonatalne teladi ogledne grupe je bila udružena sa nepovoljnim energetske statusom novorođenih jedinki, koji se ogledao u značajno nižoj koncentraciji glukoze i insulina tokom prva 2 dana neonatalnog života, i značajno višoj koncentraciji kortizola tokom prvih 7 dana neonatalnog života u odnosu na telad poreklom od netretiranih primiparnih majki.

- Hipotireoza neonatalne teladi ogledne grupe bila je udružena sa usporenim sazrevanjem IGF osovine tokom prve nedelje neonatalnog života, s obzirom da su koncentracija IGF-I i relativna zastupljenost IGFBP-2 i IGFBP-3 kod njih bile značajno niže u odnosu na telad poreklom od netretiranih primiparnih majki, sve do 7. dana života, kada su se koncentracije kod obe grupe teladi izjednačile.

- Resorpcija imunoglobulina iz kolostruma kod teladi ogledne grupe je bila slabija, što se manifestovalo nižom koncentracijom globulina u odnosu na telad

poreklom od netretiranih primiparnih majki u svim periodima ispitivanja, izuzev 0. dana neonatalnog života.

- Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju na značaj tireoidnih hormona za adekvatnu adaptaciju neonatalne teladi na ekstrauterine uslove života.

8. LITERATURA

1. Abd El-Fattah, A.M., Abd Rabo, F.H.R., EL-Dieb, S.M., El-Kashef, H.A. (2012): Changes in composition of colostrum of Egyptian buffaloes and Holstein cows. *BMC. Vet Res* 8: 19.
2. Abuid, J., Stinson, D.A., Larsen, P.R. (1973): Serum triiodothyronine and thyroxine in the neonate and the acute increases in these hormones following delivery. *J. Clin. Invest.*, 52:1195–1199.
3. Aguayo-Mazzucato, C., Zavacki, A.M., Marinelarena, A., Hollister-Lock, J., El, Khattabi, I., Marsili, A., Weir, G.C., Sharma, A., Larsen, P.R., Bonner-Weir, S.(2013): Thyroid hormone promotes postnatal rat pancreatic β -cell development and glucose-responsive insulin secretion through MAFA. *Diabetes.*, 62(5):1569-80.
4. Ahlin, K.A., Emanuelson, M., Wiktorsson, H. (1994): Rapeseed products from double-low cultivars as feed for dairy cows: effects of long-term feeding on thyroid function, fertility and animal health. *Acta Vet. Scand.*, 35: 37-53.
5. Ahlquist, J.A., Franklyn, J.A., Ramsden, D.B., Sheppard, M.C. (1989): The influence of dexamethasone on serum thyrotrophin and thyrotrophin synthesis in the rat. *Mol. Cell Endocrinol.*, 64(1):55-61.
6. Ain, K.B., Mori, Y., Refetoff, S. (1987): Reduced clearance rate of thyroxine-binding globulin (TBG) with increased sialylation: a mechanism for estrogen-induced elevation of serum TBG concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65:689 – 696.
7. Aizawa, T., Green, M. (1981): Delineation of the hypothalamic area controlling thyrotropin secretion in the rat, *Endocrinology*, 109(5)1731-1738.
8. Alarcón, P., Núñez, L., García-Sancho, J. (2001): Direct actions of adrenergic agents on rat anterior pituitary cells. *Pflugers Arch.* 442(6):834-41.
9. Alkemade, A., Unmehopa, U.A., Wiersinga, W.M., Swaab, D.F., Fliers, E. (2005): Glucocorticoids decrease thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(1):323-7.

10. Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Boucher, J.L. (2005): Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂ – generating activity. *J. Biol. Chem.*, 280: 30046-54.
11. Amma, L.L., Campos-Barros, A., Wang, Z., Vennstrom, B., Forrest, D. (2001): Distinct tissue-specific roles for thyroid hormone receptors β and α 1 in regulation of type 1 deiodinase expression. *Mol. Endocrinol.*, 15:467–475.
12. Anderson, L.L., Jeftinija, S., Scanes, C.G. (2004): Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches. *Exp Biol Med (Maywood)*. 229(4):291-302.
13. Anderson, P.D., Dalir-Naghadeh, Parkinson, T.J. (2007): Iodine deficiency in dairy cattle. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 67.
14. Andrikoula, M., Tsatsoulis, A. (2001): The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur. J. Endocrinol.*, 144(6):561-8.
15. Arafat, A.M., Weickert, M.O., Frystyk, J., Spranger, J., Schöfl, C., Möhlig, Pfeiffer, A.F. (2009): The role of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 in the insulin- mediated decrease in IGF-I bioactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 94:5093–101.
16. Arancibia, S., Tapia-Arancibia, L., Astier, H., Assenmacher, I. (1989): Physiological evidence for alpha 1-adrenergic facilitatory control of the cold-induced TRH release in the rat, obtained by push-pull cannulation of the median eminence. *Neurosci. Lett.*, 100:169–174.
17. Arrojo, E., Drigo, R., Bianco, A.C. (2011): Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 43(10):1432-41.
18. Arrojo, E., Drigo, R., Fonseca, T.L., Werneck-de-Castro, J.P., Bianco, A.C. (2013): Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim Biophys Acta.*, 1830(7):3956-64.
19. Arthur, J.R., Nicol, F., Beckett, G.J. (1993): Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and thyroid hormone deiodinases. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(2 Suppl):236S-239S.
20. Arvan, P., Di Jeso, B. (2005): Thyroglobulin structure, function, and biosynthesis. In: Braverman L, Utiger R, eds. *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. New York: Lippincott Williams Wilkins, 77–95.

21. Arvat, E., Gianotti, L., Ramunni, J., Grottoli, S., Brossa, P.C., Bertagna, A., Camanni, F. & Ghigo, E. (1995): Effect of galanin on basal and stimulated secretion of prolactin, gonadotropins, thyrotropin, adrenocorticotropin and cortisol in humans. *Eur. J. Endocrinol.*, 133(3):300-4.
22. Astapova, I., Hollenberg, A.N. (2013): The in vivo role of nuclear receptor corepressors in thyroid hormone action. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1830(7):3876-81.
23. Austin, A.R., Whitehead, D.C., LeDu, Y.L., Brownlie, J. (1980): The influence of dietary iodine on iodine in the blood serum of cows and calves in the perinatal period. *Res. Vet. Sci.*, 28(1):128-30.
24. Avivi, A., Schreiber, A.B., Shemesh, M. (1982): Isolation and Characterization of a 94,000-dalton Protein with Thyrotropic Activity from Early Bovine Placenta. *The Journal of Biological Chemistry*, 257 - 11384-11389.
25. Azizi, F., Amouzegar, A. (2011): Management of hyperthyroidism during pregnancy and lactation. *Eur. J. Endocrinol.*, 164(6):871-6.
26. Azuolas, J.K., Caple, I.W. (1984): The iodine status of grazing sheep as monitored by concentrations of iodine in milk. *Aust. Vet. J.*, 61:223-227.
27. Babitha, V., Philomina, P.T., Didleep, V. (2011): Effect of extended colostrum feeding on the plasma profile of insulin, thyroid hormones and blood glucose of crossbred pre-ruminant calves. *Indian J Physiol Pharmacol.*, 55(2):139-46.
28. Bach, I., Rhodes, S.J., Pearse, I.I., Heinzl, T., Gloss, B., Scully, K.M. (1995): P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 28;92(7):2720-4.
29. Ballard, D.L., Kitterman, J.A., Bland, R.D., Clyman, R.I, Gluckman, P.D., Platzker, A.C.G, Kaplan, S.L., Grumbach, M.M. (1982): Ontogeny and regulation of corticosteroid binding capacity in plasma of fetal and newborn lambs. *Endocrinology*, 110, 359-366.
30. Baquedano, M.S., Ciaccio, M., Dujovne, N., Herzovich, V., Longueira, Y., Warman, D.M., Rivarola, M.A., Belgorosky, A. (2010): Two novel mutations of the TSH-beta subunit gene underlying congenital central hypothyroidism undetectable in neonatal TSH screening. *J Clin Endocrinol Metab* , 95 , E98-103

31. Baqui, M.M., Gereben, B., Harney, J.W., Larsen, P.R., Bianco, A.C. (2000): Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*, 141 4309–4312.
32. Bartha, T., Kim, S.W., Salvatore, D., Gereben, B., Tu, H.M, Harney, J.W., Rudas, P., Larsen, P.R. (2000): Characterization of the 5'-flanking and 5'-untranslated regions of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive human type 2 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology*, 141, 229–237.
33. Basset, N.S., Breier, B.H., Hodgkinson, S.C., Davis, S.R., Henderson, H.V., Gluckman, P.D. (1990) Plasma clearance of radiolabelled IGF-1 in the late gestation ovine fetus. *Journal of Developmental Physiology* 1473–79.
34. Bassett, J.H., Harvey, C.B., Williams, G.R. (2003): Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol.*, 31;213(1):1-11.
35. Bassett, J.H.D., (2011): Thyroid hormone action: genomic and non-genomic effects *Endocrine Abstracts*, 25 S6.1
36. Bates, J.M., St.Germain, D.L., Galton, V.A. (1999): Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology*, 140:844–851.
37. Baumrucker, C.R., Blum, J.W. (1994): Effects of dietary recombinant human insulin-like growth factor-I on concentrations of hormones and growth factors in the blood of newborn calves. *J. Endocrinol.*, 140(1):15-21.
38. Baur, A., Bauer, K., Jarry, H., Köhrle, J. (2000): Effects of proinflammatory cytokines on anterior pituitary 5'- deiodinase type I and type II. *J Endocrinol.*, 167(3):505-15
39. Beak, S.A., Small, C.J., Ilovaiskaia, I., Hurley, J.D., Ghatei, M.A., Bloom, S.R.& Smith, D.M. (1996): Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) releases thyrotropin (TSH): characterization of binding sites for GLP-1 on alpha-TSH cells. *Endocrinology* , 137(10):4130-8.
40. Beckett, G.J., Nicol, F., Rae, P.W., Beech, S., Guo, Y., Arthur, J.R. (1993): Effects of combined iodine and selenium deficiency on thyroid hormone metabolism in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(2 Suppl):240S-243S.

41. Beech, S.G., Walker, S.W., Arthur, J.R., Lee, D., Beckett, G.J. (1995): Differential control of type-I iodothyronine deiodinase expression by the activation of the cyclic AMP and phosphoinositol signalling pathways in cultured human thyrocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*, 14(2):171-7.
42. Benker, G., Reinwein, D., (1982): Pharmacokinetics of antithyroid drugs, *Klin Wochenschr*, 60:531-539.
43. Benvenga, S., Cahnmann, H.J., Rader, D., Kindt, M., Robbins, J. (1992): Thyroxine binding to the apolipoproteins of high density lipoproteins HDL2 and HDL3. *Endocrinology.*, 131(6):2805-11.
44. Benvenga, S., Lapa, D., Trimarchi, F. (2001): Re-evaluation of the thyroxine binding to human plasma lipoproteins using three techniques. *J. Endocrinol. Invest.*, 24(5):RC16-8.
45. Berg, V., Vassart, G., Christophe, D. (1997): A zinc-dependent DNA-binding activity co-operates with cAMP-responsive-element-binding protein to activate the human thyroglobulin enhancer. *Biochem J.* 15;323 (Pt 2):349-57.
46. Bernal, A. (1996): Effects of induced hypothyroidism on ovarian response to superovulation in Brahman (*Bos indicus*) cows, M.S. thesis, Texas A&M University, College Station.
47. Bernal, A., DeMoraes, G.V., Thrift, T.A., Willard C.C., Randel R.D. (1999): Effects of induced hypothyroidism on ovarian response to superovulation in Brahman (*Bos indicus*) cows, *J. Anim. Sci.*, 77:2749-2756.
48. Bernal, J. (2005): The significance of thyroid hormone transporters in the brain. *Endocrinology.* 146(4):1698-700.
49. Berry, M.J., Kieffer, J.D., Harney, J.W., Larsen, P.R. (1991): Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase. *Journal of Biological Chemistry*, 266 14155–14158.
50. Bianco, A.C., (2011): Cracking the metabolic code for thyroid hormone signaling. *Endocrinology* 152:3306–3311
51. Bianco, A.C., Kim, B.W. (2006): Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.*, 116:2571–2579.
52. Bianco, A.C., Larsen, P.R. (2005): Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid.*, 15(8):777-86.

53. Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., Larsen, P.R. (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.*, 23:38 – 89.
54. Bizhanova, A., Kopp, P. (2009): Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology.*, 150(3):1084-90.
55. Blakesley, V.A., Scrimgeour, A., Esposito, D., Le Roith, D. (1996): Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Reviews* 7 (2):153-9.
56. Blättler, U., Hammon, H.M., Morel, C., Philipona, C., Rauprich, A., Romé, V., Le Huërou-Luron, I., Guilloteau, P., Blum, J.W. (2001): Feeding colostrum, its composition and feeding duration variably modify proliferation and morphology of the intestine and digestive enzyme activities of neonatal calves. *J Nutr.* 131(4):1256-63.
57. Bloom, S.R., Edwards, A.V. (1981): Developmental changes in pancreatic endocrine function in the young calf. *J Physiol.* 314:23-35.
58. Blum, J., Hammon, H. M. (2000): Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science*, 66, 1151–1159.
59. Blum, J., (2006): Nutritional physiology of neonatal calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90, 1–11.
60. Blum, J.W., Hadorn, U., Sallmann, H.P., Schuep, W. (1997): Delaying colostrum intake by one day impairs plasma lipid, essential fatty acid, carotene, retinol and alpha-tocopherol status in neonatal calves. *J. Nutr.*, 127(10):2024-9.
61. Blum, J.W., Hammon, H. (1999): Endocrine and metabolic aspects in milk-fed calves, *Dom Anim. Endocrinol*, 17, 219-30.
62. Blum, J.W., Zbinden, Y., Hammon, H.M., Chilliard, Y. (2005): Plasma leptin status in young calves: effects of pre-term birth, age, glucocorticoid status, suckling, and feeding with an automatic feeder or by bucket. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 28(2):119-33.
63. Bollen, M., Stalmans, W. (1988): The effect of the thyroid status on the activation of glycogen synthase in liver cells *Endocrinology.*, 122(6):2915-9.

64. Böni-Schnetzler, M., Schmid, C., Mary, J.L., Zimmerli, B., Meier, P.J., Zapf, J., Schwander, J., Froesch, E.R. (1990): Insulin regulates the expression of the insulin-like growth factor binding protein 2 mRNA in rat hepatocytes. *Mol. Endocrinol.*, 4(9):1320-6.
65. Brameld, J. M., Gilmour R. S., Buttery,P.J. (1999): Glucose and amino acids interact with hormones to control expression of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA in cultured pig hepatocytes. *J. Nutr.* 129:1298-1306.
66. Braverman, L.E., Cooper, D. (2012): Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text Lippincott. Williams & Wilkins, 218-219.
67. Breier, B.H., Oliver, M.H., Gallaher, B.W. (2000): Regulation of growth and metabolism during postnatal development. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*, (edited by Cronje' P.B.) New York: CABI, 187–204.
68. Brewer, C., Yeager, N., Di Cristofano, A. (2007): Thyroid-stimulating hormone initiated proliferative signals converge in vivo on the mTOR kinase without activating AKT. *Cancer Res.*, 1;67(17):8002-6.
69. Brokken, L.J., Bakker, O., Wiersinga, W.M., Prummel, M.F. (2005): Functional thyrotropin receptor expression in the pituitary folliculo-stellate cell line TtT/GF. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 113(1):13-20.
70. Brzozowski, A.M., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Murshudov, G.N., Verma, C., Turkenburg, J.P., de Bree, F.M., Dauter, Z. (2002): Structural origins of the functional divergence of human insulin-like growth factor-I and insulin. *Biochemistry.*, 30;41(30):9389-97.
71. Bühler, C., Hammon, H., Rossi, G.L., Blum, J.W. (1998): Small intestinal morphology in eight-day-old calves fed colostrum for different durations or only milk replacer and treated with long-R3-insulin-like growth factor I and growth hormone. *J Anim Sci.*, 76(3):758-65.
72. Butler, A.A., LeRoith, D. (2001): Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the igf1 and igf1r genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology*, 142 1685-1688.

73. Butler, S. T., Marr, A. L., Pelton, S. H., Radcliff, R. P., Lucy, M.C., Butler, W. R. (2003): Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J. Endocrinol.*, 176:205–217.
74. Cabello, G., Levieux, D. (1980): Comparative absorption of colostral IgG1 and IgM in the newborn calf. Effects of thyroxine, cortisol and environmental factors. *Ann. Rech. Vet.*, 11(1), 1-7.
75. Cabello, G., Levieux, D. (1978): The effects of thyroxine and climatic factors on colostral gammaglobulin absorption in newborn calves. *Ann. Rech. Vet.*, 9(2):309-18.
76. Cabello, G., Levieux, D. (1982): Absorption and half-life of bovine, caprine and ovine IgG1 in the newborn lamb. Effect of experimental prematurity and endocrine factors. *Ann Rech Vet.*, 12(4):421-9.
77. Cahnmann, H.J, Pommier, J., Nunez, J. (1977): Spatial requirement for coupling of iodotyrosine residues to form thyroid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74(12):5333-5.
78. Calebiro, D. (2011): Thyroid-stimulating hormone receptor activity after internalization. *Ann. Endocrinol (Paris)*. ;72(2):64-7.
79. Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J. (2010): Imaging of persistent cAMP signaling by internalized G protein-coupled receptors. *J. Mol. Endocrinol.*, 45(1):1-8.
80. Callebaut, I., Curcio-Morelli, C., Mornon, J.P., Gereben, B., Buettner, C., Huang, S., Castro, B., Fonseca, T.L., Harney, J.W., Larsen, P.R. (2003): The iodothyronine selenodeiodinases are thioredoxin-fold family proteins containing a glycoside hydrolase clan GH-A-like structure. *Journal of Biological Chemistry.*, 278(38):36887–36896.
81. Campos-Barros, A., Meinhold, H., Walzog, B., Behne, D. (1997): Effects of selenium and iodine deficiency on thyroid hormone concentrations in the central nervous system of the rat, *Eur. J. Endocrinol.*, 136(3):316-23.
82. Capen, C.C. (1995): Endocrine system. In: Thomson's Special Pathology (ed. by W.W. Carlton and M.D. McGavin), Missouri, Mosby, 250-264.

83. Carr, J.M., Owens, J.A., Grant, P.A., Walton, P.E., Owens, P.C., Wallace, J.C. (1995): Circulating insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs) and tissue mRNA levels of IGFBP-2 and IGFBP-4 in the ovine fetus. *J. Endocrinol.*, 145(3):545-57.
84. Carron, J., Morel, C., Hammon, H.M., Blum, J. W. (2005). Ontogenetic development of mRNA levels and binding sites of hepatic β -adrenergic receptors in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 28:320–330.
85. Carvalho, S.D., Kimura, E.T., Bianco, A.C., Silva, J.E. (1991): Central role of brown adipose tissue thyroxine 5'-deiodinase on thyroid hormone-dependent thermogenic response to cold. *Endocrinology*, 128 2149–2159.
86. Casabiell, X., Piñeiro, V., Tomé, M.A., Peinó, R., Diéguez, C., Casanueva, F.F. (1997): Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: A potential role in the regulation of neonatal food intake. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82:4270–4273.
87. Cassar-Malek, I., Picard, B., Kahl, S., Hocquette, J.F., (2007): Relationships between thyroid status, tissue oxidative metabolism, and muscle differentiation in bovine fetuses. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 33(1):91-106.
88. Castro, M.I., Braverman, L.E., Alex, S., Wu, C.F., Emerson, C.H. (1985): Inner-ring deiodination of 3,5,3'-triiodothyronine in the in situ perfused guinea pig placenta. *J Clin Invest. Nov.*, 76(5):1921-6.
89. Cavalieri, R.R., Castle, J.N., McMahon, F.A. (1984): Effects of dexamethasone on kinetics and distribution of triiodothyronine in the rat. *Endocrinology*, 114:215–221.
90. Çelik, I., Turkuloglu V., Zegin E. (2000): Effects of Propylthiouracil-Induced Hypothyroidism on Plasma Lipid Profile in Rabbits. *Turk J Vet Anim Sci* 24 149–152
91. Chan, S., Kachilele, S., Hobbs, E., Bulmer, J.N., Boelaert, K., McCabe, C.J., Driver, P.M., Bradwell, A.R., Kester, M., Visser, T.J., Franklyn, J.A., Kilby, M.D. (2003): Placental iodothyronine deiodinase expression in normal and growth-restricted human pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.*; 88(9):4488-95.
92. Chanda, R., McNaught, M.L., Owen C. (1952): The effect of thyroxine and thiouracil on the composition of milk. 3. The concentration of the major

- constituents and of some of the water-soluble vitamins in cow's milk. *Biochem J.*, 51(4): 543–552.
93. Chassande, O. (2003): Do unliganded thyroid hormone receptors have physiological functions? *Journal of Molecular Endocrinology.*, 31, 9–20.
 94. Chaudhary, Z.I., Iqbal, J., Rashid, J. (2003): Serum protein electrophoretic pattern in young and adult camels. *Aust. Vet. J.*, 81:625-626.
 95. Chazenbalk, G.D., Nagayama, Y., Russo, D., Wadsworth, H.L., Rapoport, B. (1990): Functional analysis of the cytoplasmic domains of the human thyrotropin receptor by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 265(34):20970-5.
 96. Chen, C.R., McLachlan, S.M., Rapoport, B. (2010): Thyrotropin (TSH) receptor residue E251 in the extracellular leucine-rich repeat domain is critical for linking TSH binding to receptor activation. *Endocrinology.*, 151(4):1940-7.
 97. Cheng, S.Y. (2000): Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 1(1-2):9-18.
 98. Cheng, S.Y., Leonard, J.L., Davis, P.J. (2010), Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr. Rev.* 31(2):139-70.
 99. Chin, W.W., Habener, J.F., Kieffer, J.D., Maloof, F. (1978): Cell-free translation of the messenger RNA coding for the alpha subunit of thyroid-stimulating hormone. *J. Biol. Chem.*, 253(22):7985-8.
 100. Christoffolete, M.A., Ribeiro, R., Singru, P. (2006): Atypical expression of type 2 iodothyronine deiodinase in thyrotrophs explains the thyroxine-mediated pituitary thyrotropin feedback mechanism. *Endocrinology*, 147:4, 1735– 1743.
 101. Cintra, A., Fuxe, K., Wikström, A.C., Visser, T., Gustafsson, J.A. (1990): Evidence for thyrotropin-releasing hormone and glucocorticoid receptor-immunoreactive neurons in various preoptic and hypothalamic nuclei of the male rat. *Brain Res.*, 1;506(1):139-44
 102. Ciosek, J., Stempniak, B. (1997): The influence of vasopressin or oxytocin on thyroidstimulating hormone and thyroid hormones' concentrations in blood plasma of euthyroid rats. *J Physiol. Pharmacol.*, 48(4):813-23.
 103. Ciullo, I., Latif, R., Graves, P., Davies, T.F., (2003): Functional assessment of the thyrotropin receptor-beta subunit. *Endocrinology.* 144(7):3176-81.

104. Civelek, T., Celik, H.A., Avci, G., Cingi C.C. (2008): Effect of dystocia on plasma cortisol and cholesterol levels in holstein heifers and their newborn calves. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52, 649-654
105. Clemmons, D.R. (1993): IGF binding proteins and their functions. *Molecular Reproduction and Development*, 35: 368-375.
106. Connor, E.E., Laiakis, E.C., Fernandes, V.M., Williams, J.L., Capuco, A.V. (2005): Molecular cloning, expression and radiation hybrid mapping of the bovine deiodinase type II (DIO2) and deiodinase type III (DIO3) genes. *Anim. Genet.*, 36(3):240-3.
107. Convey, E.M., Tucker, H.A., Smith, V.G., Zolman, J. (1973): Bovine prolactin, growth hormone, thyroxine and corticoid response to thyrotropinreleasing hormone. *Endocrinology*, 92:471-476.
108. Cooper, D.S., (2005): Antithyroid Drugs *N Engl J Med*;352:905-17.
109. Cooper, D.S., Klibanski, A., Ridgway, E.C., (1983): Dopaminergic modulation of TSH and its subunits: In vivo and in vitro studies. *Clin. Endocrinol., (Oxf)* 18(3):265-75.
110. Cooper, D.S., Saxe, V.C., Meskell, M., Maloof, F., Ridgway, E.C. (1982): Acute effects of propylthiouracil (PTU) on thyroidal iodide organification and peripheral iodothyronine deiodination: correlation with serum PTU levels measured by radioimmunoassay. *J. Clin Endocrinol. Metab.*, 54:101-7.
111. Cordano, P., Hammon, H., Blum, J.W. (1998): Tissue distribution insulin-like growth factor-I mRNA in 8-day old calves. In: *Proc of the Symposium on Growth in Ruminants*, (Blum JW, Elsasser T, Guilloteau P eds.), University of Berne, Berne, Switzerland, 20-22, 282-90.
112. Cordano, P., Hammon, H.M., Morel, C., Zurbriggen, A., Blum, J.W. (2000): mRNA of insulin-like growth factor (IGF) quantification and presence of IGF binding proteins, and receptors for growth hormone, IGF-I and insulin, determined by reverse transcribed polymerase chain reaction, in the liver of growing and mature male cattle. *Domest Anim Endocrinol.*, 19(3):191-208.
113. Coxam, V., Davicco, M., Opmeer, F.A., Ravault, J.P., Barlet, J.P. (1987): Plasma somatotropin and somatomedin C concentrations following GRF or TRH injections in newborn calves, *Reprod. Nutr. Develop.*, 27(2B), 533-545

114. Crantz, F.R., Silva, J.E., Larsen, P.R. (1982): An analysis of the sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat cerebral cortex and cerebellum. *Endocrinology*, 110:367–375.
115. Crisanti P, Omri B, Hughes E, Meduri G, Hery C, Clauser E, Jacquemin C, Saunier B. 2001The expression of thyrotropin receptor in the brain. *Endocrinology*.;142(2):812-22.
116. Curcio-Morelli, C., Gereben, B., Zavacki, A.M., Kim, B.W., Huang, S., Harney, J.W., Larsen, P.R., Bianco, A.C. (2003): In vivo dimerization of types 1, 2, and 3 iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrinology*., 144:937–946.
117. Cvejić, D., Savin, S., Stojić, V., Sinadinović, J. (1995): Development of a bovine thyrotropin (TSH) radioimmunoassay and its application in thyroid function studies in cattle. *Acta. Vet- Beograd*, 45:195–202.
118. D'Ercole, A.J., Applewhite, G.T., Underwood, L.E. (1980): Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev. Biol.*, 75: 315–328.
119. Dai, G., Levy, O., Carrasco, N. (1996): Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*., 379:458–460.
120. Darras, V.M., Visser, T.J., Berghman, L.R., Kuhn, E.R. (1992): Ontogeny of type I and type III deiodinase activities in embryonic and posthatch chicks: relationship with changes in plasma triiodothyronine and growth hormone levels. *Comparative Biochemistry and Physiology. A Comparative Physiology*, 103 131–136.
121. Davicco, M.,J., Vigouroux, E., Dardillat, C., Barlet, J.,P., (1982): Thyroxine, triiodothyronine and iodide in different breeds of newborn calves. *Reprod Nutr Dev.*, 22:355–362.
122. Davies, P.H., Sheppard, M.C., Franklyn, J.A. (1996): Regulation of type I 50-deiodinase by thyroid hormone and dexamethasone in rat liver and kidney cells. *Thyroid*, 6, 221–228.
123. Davies, T., Marians, R., Latif, R., (2002): The TSH receptor reveals itself. *J. Clin. Invest.*, 110:161–164.
124. Davis, P.J., Davis, F.B., (1996): Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid*., 6(5):497-504.

125. Davis, P.J., Davis, F.B., Mousa, S.A., Luidens, M.K., Lin, H.Y. (2011): Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 51:99-115.
126. Davis, P.J., Leonard, J.L., Davis, F.B., (2008): Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front. Endocrinol.*, 29, 211-218.
127. Davis, P.J., Shih, A., Lin, H.Y., Martino, L.J., Davis, F.B. (2000): Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J. Biol. Chem.*, 1;275(48):38032-9.
128. De Jesus, L.A., Carvalho, S.D., Ribeiro, M.O., Schneider, M., Kim, S.W., Harney, J.W., Larsen, P.R., Bianco, A.C. (2001): The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 108(9):1379-85.
129. Degroot, L.J., Jameson, J.L., (2006): *Endocrinology*. 5th ed. Vol. 2. Philadelphia, PA: Saunders.
130. DeLeon, D.D., Cohen, P., Katz, L.E.L. (2004): Growth factor regulation of fetal growth. In: (Polin RA, Fox WW, Abman SH, eds.) *Fetal and Neonatal Physiology*. 3rd ed. Philadelphia, PA:WB Saunders,1880- 1890.
131. DeMoraes, G.V., Vera-Avila, H.R., Lewis, A.W., Koch, J.W., Neuendorff, D.A., Hallfor, D.M., Reeves, J.J., Randel, R.D. (1998): Influence of hypo- and hyperthyroidism on ovarian function in Brahman cows. *J. Anim. Sci.*, 76:871-879.
132. Demori, I., Bottazzi, C., Fugassa, E. (1999): Tri-iodothyronine increases insulin-like growth factor binding protein-2 expression in cultured hepatocytes from hypothyroid rats. *J Endocrinol.*161(3):465-74.
133. Desphande, V., Venkatesh, S.G. (1999): Thyroglobulin, the prothyroid hormone: chemistry, synthesis and degradation. *Biochim Biophys Acta.* 19;1430(2):157-78.
134. Dickson, P.W., Aldred, A.R., Marley, P.D., Bannister, D., Schreiber, G. (1986): Rat choroid plexus specializes in the synthesis and the secretion of transthyretin (prealbumin). Regulation of transthyretin synthesis in choroid plexus is independent from that in liver. *J. Biol. Chem.*, 15;261(8):3475-8.
135. Dietrich, J.W., Landgrafe G., Fotiadou E.H. (2012): TSH and Thyrotropic Agonists: Key Actors in Thyroid Homeostasis. *J thyroid res.* 2012:351864.

136. Dohan, O., De la Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, C.S., Carrasco, N. (2003): The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* 24:48–77.
137. Donkin, S.S., Hammon, H. (2005): Hepatic gluconeogenesis in developing ruminants. In: (Burrin DG, Mersmann HJ, editors.) *Biology of metabolism in growing animals*. London: Elsevier, 375–90.
138. Duan, C., Xu, Q., (2005): Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 15;142(1-2):44-52.
139. Duh, Q.Y., Grossman, R.F. (1995): Thyroid growth factors, signal transduction pathways, and oncogenes. *Surg. Clin. North. Am.*, 75(3):421-37.
140. Dunn, A.D., Crutchfield, H.E., Dunn, J.T. (1991): Proteolytic processing of thyroglobulin by extracts of thyroid lysosomes. *Endocrinology*, 128(6):3073-3080.
141. Durand, D., Bauchart, D., Laplaud, P.M., Lefaivre, J., Chapman, M.J. (1990) Importance of the portal venous pathway to the transport of intestinal triglyceride-rich lipoproteins in the preruminant calf, *Reprod. Nutr. Dev.* 30, suppl. 2. 228s.
142. Dyess, E.M., Segerson, T.P., Liposits, Z., Paull, W.K., Kaplan, M.M., Wu, P., Jackson, I.M., Lechan, R.M. (1988): Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 123:2291–2297.
143. Đurđević, D., Stojić, V., Jovanović, M.J., Radaković, N. (1980): Concentration of Thyroxine, triiodothyronine and cortisol in the blood serum of ketotic cows, *Acta Vet.*, Beograd, 30, 7-12.
144. Edwards, L.J., Symonds, M.E., Warnes, K.E., Owens, J.A., Butler, T.G., Jurisevic, A., McMillen, I.C. (2001): Responses of the fetal pituitary-adrenal axis to acute and chronic hypoglycemia during late gestation in the sheep. *Endocrinology* 142: 1778–1785.
145. Eipper, B.A., Stoffers, D.A., Mains, R.E. (1992): The biosynthesis of neuropeptides: peptide α -amidation. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15:57–85.
146. Elbein, A.D. (1991): Glycosidase inhibitors: inhibitors of N-linked oligosaccharide processing. *FASEB J.* 5:3055–3063
147. Elsasser, T.H., Rumsey, T.S., Norton, S.A. (1992): Relationships between thyroid and somatotrophic axes in steers, I: Effects of propylthiouracil-induced

- hypothyroidism on growth hormone, thyroid stimulating hormone and insulin-like growth factor-1, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 9(4):261-271.
148. El-Shewy, H.M., Luttrell, L.M. (2009): Insulin-like growth factor-2/mannose-6 phosphate receptors. *Vitam. Horm.*, 80:667-97.
 149. Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T., Matsushima, N. (2004): Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins.*, 15;54(3):394-403.
 150. Erenberg, A., Omori, K., Oh, W., Fisher, D.A. (1973): The effect of fetal thyroidectomy on thyroid hormone and metabolism in maternal and fetal sheep. *Pediat. Res.*, 7:870-877
 151. Esfandiari, A., Gagelin, C., Gavaret, J.M., Pavelka, S., Lennon, A.M., Pierre, M., Courtin, F. (1994): Induction of type III-deiodinase activity in astroglial cells by retinoids. *Glia.*, 11(3):255-61.
 152. Farid, N.R., Szkudlinski, M.W. (2004): Minireview: Structural and functional evolution of the thyrotropin receptor, *Endocrinology.*, 145(9):4048-57.
 153. Farwell, A.P., Safran, M., Dubord, S., Leonard, J.L. (1996): Degradation and recycling of the substrate-binding subunit of type II iodothyronine 59 deiodonase in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 271: 16369–16374.
 154. Fayadat, L., Niccoli-Sire, P., Lanet, J., 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(10):4277-4285.
 155. Feingold, S.B., Brown, R.S. (2010): Neonatal thyroid function. *Neo Reviews.*, 11(11):e640–e646.
 156. Fekete, C., Lechan, R.M. (2007): Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropinreleasing hormone (TRH) synthesizing neurons; role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front Neuroendocrinol.* 28(2-3): 97–114.
 157. Fekete, C., Lechan, R.M. (2014): Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr. Rev.* 35:159-94.

158. Fekete, C., Legradi, G., Mihaly, E. (2000a): α -Melanocyte stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci.*, 20: 1550-8.
159. Fekete, C., Mihaly, E., Luo, L.G. (2000b): Association of cocaine and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J. Neurosci.*, 20: 9224-34.
160. Fekete, C., Singru, P.S., Sanchez, E., Sarkar, S., Christoffolete, M.A., Riberio, R.S., Rand, W.M., Emerson, C.H., Bianco, A.C., Lechan, R.M. (2006): Differential effects of central leptin, insulin, or glucose administration during fasting on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and feeding-related neurons in the arcuate nucleus. *Endocrinology*, 147:520–529.
161. Feldt-Rasmussen, U., Rasmussen A.K., (2007): Thyroid hormone transport and actions in Diseases of the Thyroid in Childhood and Adolescence, *Pediatr. Adolesc. Med. Basel*, Karger, 11 80–103.
162. Feng, Q., Gao, Y., Li, H., (1996): The effects of propylthiouracil on the fetal thyroid and serum concentration in pregnant women, *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 35:295-8.
163. Fiddes, J.C., Goodman, H.M. (1981): The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J.Mol. Appl. Genet.*, 1(1):3-18.
164. Fisher, D.A. (1991): Thyroid system ontogeny in the sheep: a model for precocial mammalian species. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 299:11-26.
165. Fisher, D.A., Nelson, J.C., Carlton, E.I., Wilcox, R.B. (2000): Maturation of human hypothalamic-pituitary-thyroid function and control. *Thyroid.*, 10(3):229-34.
166. Fisher, D.A., Odell, W.D., (1969), Acute release of thyrotropin in the newborn. *J.Clin. Invest.*, 48(9):1670-7.

167. Fisher, J.W., Li, S., Crofton, K., Zoeller, R.T., McLanahan, E.D., Lumen, A., Gilbert, M.E., (2012): Evaluation of iodide deficiency in the lactating rat and pup using a biologically based dose response (BBDR) model. *Toxicol.Sci.*, 32, 75–86.
168. Fliers, E., Boelen, A., van Trotsenburg, A. S. (2014) Central regulation of the hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis: focus on clinical aspects. *Handb. Clin. Neurol.* 124:127-38.
169. Fliers, E., Unmehopa, U.A., Alkemade, A (2006): Functional neuroanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. *Mol Cell Endocrinol*, 7;251(1-2):1-8.
170. Follet, B.K., Potts, C. (1990): Hypothyroidism affects reproductive refractoriness and the seasonal oestrus period in Welsh Mountain ewes. *Journal of Endocrinology*, 127,103-109.
171. Foord, S.M., Peters, J.R., Dieguez, C., Scanlon, M.F., Hall, R. (1983): Dopamine receptors on intact anterior pituitary cells in culture: Functional association with the inhibition of prolactin and thyrotropin. *Endocrinology*, 112(5):1567-77.
172. Forhead, A.J., Curtis, K., Kaptein, E., Visser, T.J., Fowden, A.L. (2006): Developmental control of iodothyronine deiodinases by cortisol in the ovine fetus and placenta near term. *Endocrinology*, 147(12):5988-94.
173. Forhead, A.J., Cutts, S., Matthews, P.A., Fowden, A.L. (2009): Role of thyroid hormones in the developmental control of tissue glycogen in fetal sheep near term. *Exp Physiol.*, 94(10):1079-87.
174. Forhead, A.J., Fowden, A.L., (2014): Thyroid hormones in fetal growth and parturition maturation. *J. Endocrinol.*, 221(3):R87-R103.
175. Forhead, A.J., Li, J., Gilmour, R.S., Dauncey, M.J., Fowden, A.L. (2002): Thyroid hormones and the mRNA of the GH receptor and IGFs in skeletal muscle of fetal sheep. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 282(1):E80-6.
176. Forhead, A.J., Li, J., Gilmour, R.S., Fowden, A.L. (1998): Control of hepatic insulin-like growth factor II gene expression by thyroid hormones in fetal sheep near term. *Am J Physiol.*, 275(1 Pt 1):E149-56.
177. Forhead, A.J., Poore, K.R., Mapstone, J., Fowden, A.L.(2003): Developmental regulation of hepatic and renal gluconeogenic enzymes by thyroid hormones in fetal sheep during late gestation. *J Physiol.* 548(Pt 3):941-7.

178. Fortunato, R.S., Lima de Souza, E.C., Ameziane-el Hassani, R. (2010): Functional consequences of dual oxidase-thyropoxidase interaction at the plasma membrane. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 95(12):5403-11.
179. Fowden, A.L., (1995): Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 351–363.
180. Fowden, A.L., Forhead, A.J. (2004): Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Endocrine mechanisms of intrauterine programming. Reproduction.*, 127(5):515-26.
181. Fowden, A.L., Mapstone, J., Forhead, A.J. (2001): Regulation of gluconeogenesis by thyroid hormones in fetal sheep during late gestation. *J. Endocrinol.* 170(2):461-9.
182. Fowden, A.L., Sibley, C., Reik, W., Constancia, M. (2006): Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Hormone Research* 65 (suppl 3) 49-57.
183. Fraser, H.M., McNeilly, A.S. (1982): Effect of chronic immunoneutralization of thyrotropin-releasing hormone on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis, prolactin, and reproductive function in the ewe. *Endocrinology*, 111(6):1964-73.
184. Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G. (2000): Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.*, 80:1523–1631.
185. Friesema, E.C., Ganguly, S., Abdalla, A., Manning Fox, J.E., Halestrap, A.P., Visser, T.J. (2003): Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J. Biol. Chem.* 10;278(41):40128-35.
186. Friesema, E.C., Kuiper, G.G., Jansen, J., Visser, T.J., Kester, M.H. (2006) Thyroid hormone transport by the human monocarboxylate transporter 8 and its rate-limiting role in intracellular metabolism. *Mol. Endocrinol.*, 20:2761–2772.
187. Friesema, E.C.H., Jansen, J., Visser, T. J. (2005): Thyroid hormone transporters, *Biochemical Society Transactions.* 33(1) 228–232.
188. Gallaher, B.W., Breier, B.H., Harding, J.E., Gluckman, P.D. (1995): Periconceptual undernutrition resets plasma IGFBP levels and alters the response of IGFBP-1, IGFBP-3 and IGF-1 to subsequent maternal undernutrition in fetal sheep. *Prog Growth Factor Res.*, 6(2-4):189-95.
189. Gardas, A., Lewartowska, A., Sutton, B.J., Pasięka, Z., McGregor, A.M., Banga, J.P. (1997): Human thyroid peroxidase (TPO) isoforms, TPO-1 and TPO-2:

- analysis of protein expression in Graves' thyroid tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82(11):3752-7.
190. Gardner, D.F., Cruikshank, D.P., Hays, P. M., Cooper, D.S. (1986): Pharmacology of propylthiouracil (PTU) in pregnant hyperthyroid women: correlation of maternal PTU concentrations with cord serum thyroid function tests. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 62 217–220.
 191. Gardner, M. L. (1984): Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet-A neglected field? *Biol. Rev.*, 59:289–331.
 192. Geary, E.S., Lim, M., Ceda, G.I., Ro, S., Rosenfeld, R.G., Hoffman, A.R. (1989): Triiodothyronine regulates insulin-like growth factor-I binding to cultured rat pituitary cells. *J. Neuroendocrinol.*, 1:179-184.
 193. Georgiev, I.P., Georgieva, T.M., Pfaffl, M., Hammon, H.M., Blum, J.W. (2003): Insulin-like growth factor and insulin receptors in intestinal mucosa of neonatal calves. *J. Endocrinol*, 176: 121-32.
 194. Georgiev, P., (2008): Effect of colostrum insulin-like growth factors on growth and development of neonatal calves. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 11 (2) 75-88.
 195. Georgieva, T.M., Georgiev, I.P., Ontsouka, E., Hammon, H.M., Pfaffl, M.W., Blum, J.W. (2003): Abundance of message for insulin-like growth factors-I and -II and for receptors for growth hormone, insulin-like growth factors-I and -II, and insulin in the intestine and liver of pre- and full-term calves. *J. Anim. Sci.*, 81: 2294-300.
 196. Geras, E.J., Gershengorn, M.C. (1982): Evidence that TRH stimulates secretion of TSH by two calcium-mediated mechanisms. *Am. J. Physiol.*, 242(2):E109-14.
 197. Gereben, B., Goncalves, C., Harney, J.W., Larsen, P.R., Bianco, A.C. (2000): Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol. Endocrinol.*, 14:1697–1708.
 198. Gereben, B., Zavacki, A.M., Ribich, S., Kim, B.W., Huang, S.A., Simonides, W.S., Zeöld, A., Bianco, A.C. (2008): Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocrine Reviews.*, 29(7):898–938.

199. Gesundheit, N., Weintraub, B.D. (1986): Mechanisms and regulation of TSH glycosylation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 205:87-105.
200. Gilbert, M.E., Hedge, J.M., Valentin-Blasini, B.C., Kannan, K., Tietge, J., Zoeller, R.T., Crofton, K.M., Jarrett, J.M., Fisher, J.W. (2013): An animal model of marginal iodine deficiency during development: The thyroid axis and neurodevelopmental outcome. *Toxicol. Sci.*, 132, 177–195.
201. Gill, R.K., Mahmood, S., Sodhi, C.P., Nagpaul, J.P., Mahmood, A. (1999): IgG binding and expression of its receptor in rat intestine during postnatal development. *Indian J Biochem Biophys.* 36(4):252–7.
202. Giralt, M., Casteill, L., Viñas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Robelin, J., Villarroya, F., (1989): Iodothyronine 5'-deiodinase activity as an early event of prenatal brown-fat differentiation in bovine development. *Biochem J.* 15;259(2):555-9.
203. Girard, J. (1989): Control of fetal and neonatal glucose metabolism by pancreatic hormones. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.*, 3:817-836.
204. Girard, J., Duée, P.H., Ferré, P., Pégurier, J.P., Escriva, F., Decaux, J.F. (1985): Fatty acid oxidation and ketogenesis during development. *Reprod. Nutr. Dev.*, 25(1B):303-19.
205. Giustina, A., Wehrenberg, W.B. (1995): Influence of thyroid hormones on the regulation of growth hormone secretion. *Eur J Endocrinol.* 133(6):646-53.
206. Gluckman, P.D., Pinal, C.S. (2003): Regulation of fetal growth by the somatotrophic axis. *J Nutr.*, 133(5 Suppl 2):1741S-1746S.
207. Godfrey, R.W., Smith, S.D., Guthrie, M.J., Stanko, R.L., Neuendorff, D.A., Randel, R.D. (1991): Physiological responses of newborn *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* calves after exposure to cold. *J. Anim. Sci.*, 69(1):258-63.
208. Gomes, V., Madureira, K.M., Soriano, S., Melville, A.M., Libera, P.D., Blagitz, M.G., Benes, F.J. (2011): Factors affecting immunoglobulin concentration in colostrum of healthy Holstein cows immediately after delivery. *Pesq. Vet. Bras.*, 31(Supl.1):53-56.
209. Gordon, D.F., Lewis, S.R., Haugen, B.R., James, R.A., McDermott, M.T., (1997): Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter. *J. Biol. Chem.*, 272: 24339–24347.

210. Gordon, D.F., Tucker, E.A., Tundwal, K., Hall, H., Wood, W.M., Ridgway E.C. (2006): MED220/thyroid receptor-associated protein 220 functions as a transcriptional coactivator with Pit-1 and GATA-2 on the thyrotropin-beta promoter in thyrotropes, *Mol Endocrinol.*, 20(5):1073-89
211. Goret, E.A., Vanjonack, W.J., Johnson, H.D. (1974): Plasma TSH and thyroxine in six breeds of cattle. *J. Anim., Sci.* 38:1335.
212. Goulart-Silva, F., Serrano-Nascimento, C., Nunes, M.T. (2011): Hypothyroidism decreases proinsulin gene expression and the attachment of its mRNA and eEF1A protein to the actin cytoskeleton of INS-1E cells. *Braz J Med Biol Res.*, 44(10):1060-7.
213. Govoni, K.E., Hoagland, T.A., Zinn, S.A. (2004): The ontogeny of the somatotropic axis in Hereford calves from birth to one year of age and its response to administration of exogenous bovine somatotropin. *J Anim Sci.*, 82(6):1646-55.
214. Grasberger, H., Refetoff, S. (2006): Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J. Biol. Chem.*, 7;281(27):18269-72.
215. Grasberger, H., Van Sande, J., Hag-Dahood Mahameed, A., Tenenbaum-Rakover, Y., Refetoff, S. (2007): A familial thyrotropin (TSH) receptor mutation provides in vivo evidence that the inositol phosphates/Ca²⁺ cascade mediates TSH action on thyroid hormone synthesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 92(7):2816-20.
216. Grongnet, J.F.(1984): Metabolic consequences of induced hypoxia in newborn lambs. *Ann Rech Vet.*15(1):17-28.
217. Grongnet, J.F., Grongnet-Pinchon, E., Witowski, A., (1985): Neonatal level of plasma throxine in male and female calves fed a colostrum or imunoglobulin diet or fastet for the first 28 hours of life. *Reprod. Nutr. Dev.*, 25.537-43.
218. Grossmann, M., Weintraub, B.D., Szkudlinski, M.W. (1997): Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family. *Endocr Rev.*, 18(4):476-501.
219. Grubić, G., Adamović, M. (2003): *Ishrana visokoproizvodnih krava*. Beograd, 65-78.

220. Grütter, R., Blum, J.W. (1991): Insulin and glucose in neonatal calves after peroral insulin and intravenous glucose administration. *Reprod. Nutr. Dev.*, 31:389–97.
221. Guadano-Ferraz, A., Obregon, M.J., StGermain, D.L., Bernal, J. (1997): The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:10391– 10396.
222. Gueorguieva, T.M., Gueorguiev, I.P. (1997): Serum cholesterol concentration around parturition and in early lactation in dairy cows. *Revue de Medecine Veterinaire*, 148, 241-244.
223. Guerra, C., Roncero, C., Porrás, A., Fernández, M., Benito, M. (1996): Triiodothyronine Induces the Transcription of the Uncoupling Protein Gene and Stabilizes its mRNA in Fetal Rat Brown Adipocyte Primary Cultures. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 2076-2081.
224. Guillemin, R. (2005): Hypothalamic hormones a.k.a.hypothalamic releasingfactors. *J. Endocrinol.*, 184, 11–28.
225. Guilloteau, P., Zabielski, R., Blum, J.W. (2009): Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations. *J. Physiol. Pharmacol.*, 60 Suppl 3:37-46.
226. Gullberg, H., Rudling, M., Saltó, C., Forrest, D., Angelin, B., Vennström, B. (2002): Requirement for thyroid hormone receptor beta in T3 regulation of cholesterol metabolism in mice. *Molecular Endocrinology*, 16(8)1767- 1777.
227. Guo, F., Bakal, K., Minokoshi, Y., Hollenberg, A.N. (2004): Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology*, 145(5):2221-7.
228. Gupta, B., Moolchandani, A., Sareen, M. (2010): Effect of induced Hypothyroidism on plasma cholesterol and bilirubin in Marwari Sheep. *Veterinary World*, 3(7): 323-325
229. Guyot, H., Lebreton, P., Alves de Oliveira, L., Sulon, J., Beckers, J., Rollin, F., (2007b): Thyrotropin in newborn calves as a tool for diagnosing hypothyroidism. *British Cattle Veterinary Assoc.* 15/3, 271-275
230. Guyot, H., Sulon, J., Beckers, J.F., Closset, J., Lebreton, P., Alves de Oliveira, L., Rollin, F. (2007a): Development and validation of a radioimmunoassay for thyrotropin in cattle, *J Vet. Diagn. Invest.*, 19(6):643-51.

231. Hadorn, U., Hammon, H., Bruckmaier, R.M., Blum, J.W. (1997): Delaying colostrum intake by one day has important effects on metabolic traits and on gastrointestinal and metabolic hormones in neonatal calves. *J. Nutr.*, 127(10):2011-23.
232. Hagen, G.A., Solberg, L.A.Jr. (1974): Brain and cerebrospinal fluid permeability to intravenous thyroid hormones. *Endocrinology*, 95:1398–1410.
233. Hagenbuch, B., Meier, P.J. (2004): Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.*, 447(5):653-65.
234. Hamilton, J.A., Benson, M.D. (2001): Transthyretin: a review from a structural perspective. *Cell Mol. Life Sci.*, 58(10):1491-521.
235. Hammon, H. M., Schiessler, G., Nussbaum, A., Blum, J. W. (2002): Feed intake patterns, growth performance and metabolic and endocrine traits in calves fed unlimited amounts of colostrums and milk by automate, starting in the neonatal period. *J. Dairy Sci.* 85: 3352-3362.
236. Hammon, H., Blum, J.W. (1997): The somatotropic axis in neonatal calves can be modulated by nutrition, growth hormone, and Long-R3-IGF-I. *Am J. Physiol.*, 273(1 Pt 1):E130-8.
237. Hammon, H.M., Blum, J.W. (1998): Metabolic and endocrine traits of neonatal calves are influenced by feeding colostrum for different durations or only milk replacer. *J. Nutr.*, 128(3):624-32.
238. Hammon, H.M., Sauter, S.N., Reist, M., Zbinden, Y., Philipona, C., Morel, C., Blum, J.W. (2003): Dexamethasone and colostrum feeding affect hepatic gluconeogenic enzymes differently in neonatal calves. *J. Anim. Sci.*, 81:3095–106.
239. Hammon, H.M., Steinhoff-Wagner, J., Flor, J., Schönhusen, U., Metges, C.C. (2013): Lactation Biology Symposium: role of colostrum and colostrum components on glucose metabolism in neonatal calves *J Anim Sci.*, 91(2):685-95.
240. Hammon, H.M., Steinhoff-Wagner, J., Schönhusen, U., Metges, C.C., Blum, J.W. (2012): Energy metabolism in the newborn farm animal with emphasis on the calf: endocrine changes and responses to milk-born and systemic hormones. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 43(2):171-85.

241. Hammon, H.M., Zanker, I.A., Blum, J.W. (2000): Delayed colostrum feeding affects IGF-I and insulin plasma concentrations in neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 83, 85-2.
242. Harakawa, S., Yamashita, S., Tobinaga, T., Matsuo, K., Hirayu, H., Izumi, M., Nagataki, S., Melmed, S. (1990): In vivo regulation of hepatic insulin-like growth factor-1 messenger ribonucleic acids with thyroid hormone. *Endocrinol Jpn.*, 37(2):205-11.
243. Harris, M., Aschkenasi, C., Elias, C.F. (2001): Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J. Clin. Invest.*, 107 : 111-20.
244. Hashimoto, K., Zanger, K., Hollenberg, A.N., Cohen, L.E., Radovick, S., Wondisford, F.E. (2000): cAMP response element-binding protein-binding protein mediates thyrotropin-releasing hormone signaling on thyrotropin subunit genes. *J Biol Chem.* 27;275(43):33365-72.
245. Heasman, L., Clarke, L., Stephenson, T.J., Symonds, M.E. (1999): The influence of maternal nutrient restriction in early to mid-pregnancy on placental and fetal development in sheep. *Proc Nutr Soc.*, 58(2):283-8.
246. Hedbacker, K., Birsoy, K., Wysocki, R.W., Asilmaz, E., Ahima, R.S., Farooqi, I.S., Friedman, J.M. (2010): Antidiabetic effects of IGFBP2, a leptin-regulated gene. *Cell Metab.*, 11(1):11-22.
247. Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E.C., de Jong, M., Krenning, E.P, Visser, T.J. (2001): Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr. Rev.*, 22(4):451-76.
248. Hernandez, A., Martinez, M.E., Fiering, S., Galton, V.A., Germain, St. D. (2006): Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis *J. Clin. Invest.*, 116(2): 476–484.
249. Hernandez, A., Obregon, M.J. (1995): Presence of growth factors-induced type III iodothyronine 5-deiodinase in cultured rat brown adipocytes. *Endocrinology.*, 136 4543–4550.
250. Hernandez, M.,V., Kevin, M., E., Reinke, E.,P., Oxender, W.,D., Hafs, H.,D., (1972): Thyroid function in the prenatal and neonatal bovine. *Journal of animal science.*, 34:780-785.

251. Hernandez, M.V., Etta, K.M., Reineke, E.P., Oxender, W.D., Hafs, H.D. (1972): Thyroid function in the prenatal and neonatal bovine. *J. Anim. Sci*, 34:780-785.
252. Herosimczyk, A., Lepczyński, A., Dratwa-Chałupnik, A., Kurpińska, A., Klonowska, A., Skrzypczak, W.F.(2011): Age-related changes of selected blood biochemical indicators in dairy calves during their first week of life. *Folia Biol (Krakow)*. 59 (1-2):25-30.
253. Herosimczyk, A., Lepczyński, A., Ozgo, M., Dratwa-Chałupnik, A., Michałek, K., Skrzypczak, W.F. (2013): Blood plasma protein and lipid profile changes in calves during the first week of life. *Pol. J. Vet. Sci.*, 16(3):425-34.
254. Hetzel, B.S., Maberly, G.F. (1986); Trace Elements in Human and Animal Nutrition. (ed. W. Mertz), London, Academic Press., 2, 139.
255. Hetzel, B.S., Mano, M.T. (1989): A Review of Experimental Studies of Iodine Deficiency During Fetal Development. *J. Nutr.*, 119(2):145-51.
256. Hillman, N.H., Kallapur, S.G., Jobe, A.H. (2012): Physiology of transition from intrauterine to extrauterine life. *Clin Perinatol*. 39(4):769-83.
257. Hocquette, J.F., Bauchart, D. (1999): Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reprod Nutr Dev.*, 39(1):27-48.
258. Hoffman, B., Wagner, W.C., Giménez, T. (1976): Free and conjugated steroids in the maternal and fetal plasma in the cow near term. *Biol. Reprod.*, 15: 126-133.
259. Horger, E.O., Kenimer, J.G., Azukizawa, M., Hershman, J.M., Kansal, P.C., Leaming, A.B. (1976): Failure of triiodothyronine to prevent propylthiouracil-induced hypothyroidism and goiter in fetal sheep. *Obstetrics and Gynecology*, 47, 46-49.
260. Hough, R.L., McCarthy, F.D., Thatcher, C.D., Kent, H.D., Eversole, D.E.(1990): Influence of glucocorticoid on macromolecular absorption and passive immunity in neonatal lambs. *J. Anim.* 68,2459-2464.
261. Hossenlop, P., Seurin, D., Segovia-Quinson, B., Hardouin, S., Binoux, M., (1986): Analysis of serum insulin-like growth hormone binding proteins using Western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal Chem*, 154, 138-143.

262. Hristov, S.V., Bešlin, R.M., (1991): Stres domaćih životinja, Poljoprivredni fakultet Beograd, 122.
263. Huang, D.W., Wang, J.X., Liu, Q.Y., Chu, M.X., Di, R., He, J.N., Cao, G.L., Fang, L., Feng, T., Li, N. (2013): Analysis on DNA sequence of TSHB gene and its association with reproductive seasonality in goats. *Mol. Biol. Rep.*, 40(2):1893-904.
264. Huang, P., Chandra, V., Rastinejad, F. (2010): Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.*, 72:247-72.
265. Huang, S.A., Dorfman, D.M., Genest, D.R., Salvatore, D., Larsen, P.R. (2003): Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88(3):1384-8.
266. Huang, T.S., Beredo, A., Solomon, D.H., Chopra, I.J. (1986): The inner ring (5-) monodeiodination of thyroxine (T4) in cerebral cortex during fetal, neonatal, and adult life. *Metabolism* 35 272–277.
267. Huber, J.T., Jacobson, N.L., Allen, R.S., Hartman, P.A. (1961): Digestive enzyme activities in the young calf. *J. Dairy Sci.* 44:1494-1501.
268. Hulbert, A.J. (2000): Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol Rev Camb. Philos. Soc.*, 75(4):519-631.
269. Huo. L., Munzberg, H., Nillni, E., Bjorbaek, C. (2004): Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic TRH gene expression by leptin. *Endocrinology*, 145 2516–2523.
270. Huszenica, G.Y., Kulcsar, M., Rudas P. (2002): Clinical endocrinology of thyroid gland function in ruminants. *Vet. Med. Czech*, 47, (7): 199–210.
271. Ibrahim, R.E., Maglad, M.A., Adam, S.E., Mirghani, T.E., Wasfi, I.A. (1984): The effect of altered thyroid status on lipid metabolism in Nubian goats. *Comp Biochem Physiol B.* 77(3):507-12.
272. Igarashi, M., Nagata, A. (2003): Molecular cloning, sequencing and functional expression of porcine thyrotropin (TSH) receptor cDNA1). *Clin. Chem. Lab. Med.*, (6):796-803.

273. Ilgaža, A., Birģele, E., (2003): Dynamics of glucose in postnatal ontogenesis in calves in association with age and feed, *Veterinarija Ir Zootechnika*. 21 (43) 1392-2130.
274. Ingalls, J.R., Sharma, H.R. (1975): Feeding of Bronowski, Span and commercial rapeseed meals with or without addition of molasses or flavor in the rations of lactating cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 55: 721-729.
275. Irmak, K., Sen, I., Birdane, F.M. (2004): Throxine and Triiodothyronine levels in premature calves. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Dek.*, 10(1): 83-85.
276. Jackson, L., Williams, F.L., Burchell, A., Coughtrie, M.W., Hume, R. (2004): Plasma catecholamines and the counterregulatory responses to hypoglycemia in infants: a critical role for epinephrine and cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 6251–6256.
277. Jacob, S.K., Ramnath, V., Philomina, P.T., Raghunandhanan, K.V., Kannan, A. (2001): Assessment of physiological stress in periparturient cows and neonatal calves, *Indian J Physiol Pharmacol*, 45, 233-8.
278. Jaeschke, H., Schaarschmidt, J., Günther, R., Mueller, S. (2011): The hinge region of the TSH receptor stabilizes ligand binding and determines different signaling profiles of human and bovine TSH. *Endocrinology*, 152(10):3986-96.
279. Jain, A.K., Sharma, I.J., Tripathi, R.K., Agrawal, R.G. Quadri, M.A. (2006): Status of thyroid hormones and development of internal defense of neonatal buffalo calves and cow calves from precolostral feeding through 91 days. *Buffalo Bulletin*, Vol.25 No.4.
280. Jakson, I.M., (1982): Thyrotropin-releasing hormone. *N. Engl. J. Med.* 21;306(3):145-55.
281. Jankowiak, D., Kochel, A., Drozd, R., Kowalska, J., Muszczyriski, Z. (2010): The changes of concentration of the triglycerides, total cholesterol, HDL and LDL cholesterol in the blood plasma of the Limousine breed calves in the first ten days of the postnatal life. *Acta Sci Pol, Zootechnica* 9: 107-118.
282. Jansen, J., Friesema, E.C. Milici, C., Visser, T.J. (2005): Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* 15 757–768.
283. Janssen, O.E., Lahner, H., Grasberger, H., Spring, S.A., Saller, B., Mann, K., Refetoff, S., Einspanier, R. (2002): Characterization and primary structures of

- bovine and porcine thyroxine-binding globulin. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 15;186(1):27-35.
284. Jensen, A.R., Elnif, J., Burrin, D.G., Sangild, P.T.(2011): Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet-dependent. *J. Nutr.* 132 (in press).
285. Jeyakumar, M., Liu, X.F., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bagchi, M.K. (2007): Phosphorylation of thyroid hormone receptor-associated nuclear receptor corepressor holocomplex by the DNA-dependent protein kinase enhances its histone deacetylase activity. *J. Biol. Chem.*, 30;282(13):9312-22.
286. Ježek, J., Klopčič, M., Klinkon, M. (2006): Influence of age in biochemical parameters in calves. *Bull Vet Inst Pulawy* 50, 211-214.
287. Jiang, D., Ma, S., Jing, F., Xu, C., Yan, F., Wang, A., Zhao, J. (2015): Thyroid-stimulating hormone inhibits adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes through the PKA pathway. *PLoS One*, 15;10(1):e0116439.
288. Jiang, X., Dias, J.A., He, X. (2014): Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling. *Mol. Cell Endocrinol.*, 25;382(1):424-51
289. Jin, T., Teng, X. (2014): Update on Lipid Metabolism and Thyroid Disorders. *J Endocrinol Diabetes Obes* 2(3): 1043
290. Johke, T. (1978): Effects of TRH on circulating growth hormone, prolactin and triiodothyronine levels in the bovine. *Endocrinol. Japon.*, 25:19–26.
291. Johnston, C.A, Gibbs, D.M., Negro-Vilar, A. (1983): High concentrations of epinephrine derived from a central source and of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in hypophysial portal plasma. *Endocrinology.* 113(2):819-21.
292. Jones, J., Clemmons, D., (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.*, 16, 3-34.
293. Jovanović, M., Djurdjević, Dj., Stojić, V. (1982): Serum thyroxine and triiodothyronine in newborn calves. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 32 73-78.
294. Kaczur, V., Puskas, L.G., Nagy, Z.U., Miled, N., Rebai, A., Juhasz, F., Kupihar, Z., Zvara, A., Hackler, L. JrFarid, N.R. (2007): Cleavage of the human thyrotropin receptor by ADAM10 is regulated by thyrotropin. *J. Mol. Recognit.*, 20(5):392-404.

295. Kaczur, V., Racz, I., Szendroi, A., Takacs, M., Farid, N.R. (2002): The cysteine-rich C-flanking region of the thyrotropin receptor has very ancient phylogenetic origins: implications from sequence analysis. *J. Endocr. Genet*, 3:46–54
296. Kakucska, I., Qi, Y. Lechan, R.M. (1995): Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 136 2795–2802.
297. Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., (2008): *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th ed. Elsevier Academic Press, London, UK.
298. Kang, S.H., Kim, J.U., Kim, Y., Han, K.S., Lee, J.W., Imm, J.U., Oh, S., Park, J.D., Moon, Y.I., Kim, S.H., (2007): Changes in the Levels of Insulin-like Growth Factors (IGF-I and IGF-II) in Bovine Milk According to the Lactation Period and Parity *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 20 (1) : 119 – 123.
299. Karapanou, O., Papadimitriou, A. (2011): Thyroid hormone transporters in the human. *Hormones (Athens)*, 10(4):270-9.
300. Kariya, K., Dawson, E., Neal, R.A. (1983): Toxic effects of propylthiouracil in the rat. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 40, 333-336.
301. Karras, S., Krassas, G.E. (2012): Breastfeeding and Antithyroid Drugs: A View from Within. *European Thyroid Journal*, 1(1):30-33.
302. Kaur, N., Lu, X., Gershengorn, M.C., Jain, R. J. (2005): Thyrotropin-releasing hormone (TRH) analogues that exhibit selectivity to TRH receptor subtype 2. *Med. Chem.*, 22; 48(19):6162-5.
303. Kawaoi, A., Tsuneda, M. (1986): Effects of thyroidectomy and administration of propylthiouracil (PTU) or thyrotropin (TSH) to pregnant rats on the functional development of the fetal thyroid gland an immunohistochemical study. *Endocrinol Jpn.*, 33(6):835-41.
304. Kazmer, G.W., Barnes, M.A., Akers, R.M., Pearson, R.E., (1986): Effect of Genetic Selection for Milk Yield and Increased Milking Frequency on Plasma Growth Hormone and Prolactin Concentration in Holstein Cows. *J. Anim. Sci.*, 63:1220-1227.

305. Kennedy, J.A., Wellby, M.L., Zotti, R. (1995): Effect of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 on the control of thyrotropin secretion. *Life Sci.* 57(5):487-501.
306. Kester, M.H., Kuiper, G.G., Versteeg, R., Visser, T.J. (2006): Regulation of type III iodothyronine deiodinase expression in human cell lines. *Endocrinology.* 147(12):5845-54
307. Kim, P.S., Arvan, P. (1991): Folding and assembly of newly synthesized thyroglobulin occurs in a pre-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.*, 5;266(19):12412-8.
308. Kim, S.W., Harney, J.W., Larsen, P.R. (1998): Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology*, 139(12):4895-905.
309. Kinne, A., Kleinau, G., Hoefig, C.S., Grüters, A., Köhrle, J., Krause, G., Schweizer, U. (2010): Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8. *J. Biol. Chem.* 285(36):28054-63.
310. Kinne, A., Schülein, R., Krause, G. (2011): Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Res.*, 3;4 Suppl 1:S7.
311. Kirovski D, Lazarević M, Baričević-Jones, I., Nedić, O., Masnikosa, R., Nikolić, J.A., (2008): Effect of peroral insulin and glucose on circulating insulin-like growth factor-1, its binding proteins and thyroid hormones in neonatal calves. *Can. J. Vet. Res.*, 72, 253-8.
312. Kirovski, D., (2015): Endocrine and metabolic adaptations of calves to extra-uterine life. *Acta Veterinaria*, 65 (3), 297-318.
313. Kirovski, D., Lazarević, M., Stojić, V., Šamanc, H., Vujanac, I., Nedić, O., Masnikosa R. (2011): Hormonal status regulation of glycemia in neonatal calves during the first hours of postnatal life, *Acta Veterinaria (Beograd)*, 61(4): 349-361.
314. Kirovski, D., Stojić, V., Nikolić, J.A. (2002): Serum levels of insulin-like growth factor-I and total protein in newborn calves offered different amounts of colostrums, *Acta Vet (Belgrade)*, 52, 285-98.

315. Kirovski, D., Šamanc, H., Fratrič, N., Gvozdić, D., Hristov, S., Sladojević, Ž., Mircu, C., Tulcan, C. (2009): Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G klase u krvi neonatalne teladi različite telesne mase na rođenju. *Vet. Glasnik*, 63 (5-6) 321 – 329.
316. Kirovski, D., Vujanac, I., Prodanović, R., Đurić, M., Sladojević, Ž., Savić, Đ. (2014): Biološki značaj razlika u sastavu kolostruma i mleka krava i krmača. *Vet. Glasnik*, 68 (3-4) 175 – 188.
317. Klaff, L.J., Barron, J.L., Levitt, N.S., Ling, N., Millar, R.P. (1982): Somatostatin-28 inhibits thyroid-stimulating hormone release in man. *S. Afr. Med. J.*, 11;62(25):929-30.
318. Klein, A.H., Oddie, T.H., Fisher, D.A. (1980): Iodothyronine kinetic studies in newborn lamb, *J. Dev. Phys.*, 2,29.
319. Kleinau, G., Neumann, S., Grüters, A., Krude, H., Biebermann, H. (2013): Novel insights on thyroid-stimulating hormone receptor signal transduction. *Endocrine Reviews*, 34(5):691–724.
320. Klempt, M., Bingham, B., Breier, B. H., Baumbach, W. R., Gluckman, P.D. (1993): Tissue distribution and ontogeny of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and ligand binding to hepatic tissue in the midgestation sheep fetus. *Endocrinology*, 132: 1071–1077.
321. Klibanski, A., Milbury, P.E., Chin, W.W., Ridgway, E.C. (1983): Direct adrenergic stimulation of the release of thyrotropin and its subunits from the thyrotrope in vitro *Endocrinology*. 113(4):1244-9
322. Knoeff, A.A., Nichols, C.W., Wolff, J.Jr. (1949): The fetal bovine thyroid; morphogenesis as related to iodine accumulation. *Endocrinology.*, 45(3):242-9.
323. Knowles, T.G., Edwards, J.E., Bazeley, K.J., Brown, S.N., Butterworth, A., Warriss, P.D. (2000): Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Vet Rec.*, 18;147(21):593-8.
324. Koenig, R.J. (2003): Ubiquitinated deiodinase: not dead yet. *J. Clin. Invest.*, 112:145–147.
325. Kohn, L. D., Saji, M., Kosugi, M., Ban, T., Giuliani, C., Hidaka, A., Shimura, H., Shimura, Y., Okajima, F. (1993): In: *Thyroid Diseases: Basic Science, Pathology,*

- Clinical and Laboratory Diagnosis. Troncone L, Shapiro B, Satta M A, Monaco F, editors. Boca Raton, FL: CRC Press; 59–118.
326. Kokić, B., Palić, D. (2012): Glukozinolati uljane repice kao antinutritivni faktori u ishrani životinja, Ratar. Povrt., N.Sad, 49 113-118.
 327. Koller, K.J., Wolff, R.S., Warden, M.K., Zoeller, R.T. (1987): Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84(20):7329-33.
 328. Konaka, S., Yamada, M., Satoh, T., Ozawa, H., Watanabe, E., Takata, K. (1997): Expression of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor mRNA in somatotrophs in the anterior pituitary. *Endocrinology*, 138, 827–830.
 329. Koopdonk-Kool, J.M., de Vijlder, J.J., Veenboer, G.J., Ris-Stalpers, C., Kok, J.H., Vulsma, T., Boer, K., Visser, T.J. (1996): Type II and type III deiodinase activity in human placenta as a function of gestational age. *Clin Endocrinol Metab.*, 81(6):2154-8.
 330. Kopp, P. (2005): Thyroid hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman L, Utiger R, eds. *Werner and Ingbar's The Thyroid: a fundamental and clinical text*. 9th ed. New York: Lippincott Williams Wilkins, 52–76.
 331. Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985): Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, 54:631-64.
 332. Korytko, A.I., Cuttler, L. (1997): Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression. *J. Endocrinol.* 152(2):R13-7.
 333. Kossila, V., (1967): On the weight and basic structural components of the thyroid in dairy cattle, *Acta Agralia Fennica*, 109:1.
 334. Kostecka, Z., Blahovec, J. (1999): Insulin-like growth factor binding proteins and their functions (minireview). *Endocrine regulations*, 33, 90-94.
 335. Kostecka, Z., Blahovec, J. (2002): Animal insulin-like growth factor binding proteins and their biological functions. *Vet. Med. Czech*, 47, (2–3): 75–84.
 336. Kraft, W., Dürr, U.M. (1999): Harnapparat. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, (Ed. W. Kraft, U.M. Dürr), 169-200, Schattauer, ISBN 978-3794519422, Stuttgart, Germany.

337. Krause, G., Kreuchwig, A., Kleinau, G. (2012): Extended and structurally supported insights into extracellular hormone binding, signal transduction and organization of the thyrotropin receptor. *PLoS One*, 7(12):e52920.
338. Kühne, S., Hammon, H.M., Bruckmaier, R.M., Morel, C., Zbinden, Y., Blum, J.W. (2000): Growth performance, metabolic and endocrine traits, and absorptive capacity in neonatal calves fed either colostrum or milk replacer at two levels. *J. Anim. Sci.*, 78(3):609-20.
339. Kuiper, G.G., Kester, M.H., Peeters, R.P., Visser, T.J. (2005): Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid.*, 15(8):787-98.
340. Kuliawat, R., Ramos-Castañeda, J., Liu, Y., Arvan, P. (2005): Intracellular trafficking of thyroid peroxidase to the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 29;280(30):27713-8.
341. Kurlak, L.O., Mistry, H.D., Kaptein, E., Visser, T.J., Broughton Pipkin, F. (2013): Thyroid hormones and their placental deiodination in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Placenta.*;34(5):395-400.
342. Kursawe, R., Paschke, R. (2007): Modulation of TSHR signaling by posttranslational modifications. *Trends Endocrinol. Metab.*, 18(5):199-207.
343. Kusenda, M., Kaske, M., Piechotta, M., Locher, L., Starke, A., Huber, K., Rehage J. (2013): Effects of dexamethasone-21-isonicotinate on peripheral insulin action in dairy cows 5 days after surgical correction of abomasal displacement. *J Vet Intern Med.*;27(1):200-6
344. Lam, K.S., Wong, R.L. (1999): Thyroid hormones regulate the expression of somatostatin receptor subtypes in the rat pituitary. *Neuroendocrinology*, 69(6):460-4.
345. Lamas, L., Taurog, A., Salvatore, G., Edelhoeh, H. (1974): Preferential synthesis of thyroxine from early iodinated tyrosyl residues in thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 10;249(9):2732-7.
346. Lamberts, S.W., Zuyderwijk, J., den Holder, F., van Koetsveld, P., Hofland, L. (1989): Studies on the conditions determining the inhibitory effect of somatostatin on adrenocorticotropin, prolactin and thyrotropin release by cultured rat pituitary cells *Neuroendocrinology*, 50(1):44-50.

347. Larsson, B., Traven, M., Hulten, C., Hard, Af Segerstad, C., Belák, K., Alenius, S. (1995): Serum concentrations of thyroid hormones in calves with a transieny or persistent infection with bovine viral diarrhoea virus, *Res. Vet. Sci.*, 58, 186-9.
348. Larsson, M., Pettersson, T. (1987): Purification and partial characterization of thyroid hormone binding proteins in canine serum. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 4(4):215-29.
349. Larsson, M., Pettersson, T., Carlström, A. (1985): Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 58(3):360-75.
350. Latif, R., Ali, M.R., Mezei, M., Davies, T.F. (2015): Transmembrane domains of attraction on the TSH receptor. *Endocrinology*. 156(2):488-98.
351. Latimer, A.M., Hausman, G.J., McCusker, R.H., Buonomo, F.C. (1993): The effects of thyroxine on serum and tissue concentrations of insulin-like growth factors (IGF-I and -II) and IGF-binding proteins in the fetal pig. *Endocrinology.*, 133(3):1312-9.
352. Laudet, V. (2011): The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Curr. Biol* 21:726–737
353. Lawrence, L.J., Fowler, V.R., Novakofski, J.E.: (2012): *Growth of Farm Animals*. 3rd Edition. CABI Wallingford UK, Cambridge, Ma, USA, XV, 147-148.
354. Lazar, M.A. (2003): Thyroid hormone action: a binding contract. *J. Clin. Invest.*, 112(4):497-9.
355. Lechan, R.M., Fekete, C. (2006): The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog. Brain. Res.*, 153:209-35.
356. Lechan, R.M., Fekete, C., (2004): Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): Mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome. *J. Endocrinol. Invest.* 27: 105-119.
357. Lechan, R.M., Kakuscka, I. (1992): Feedback regulation of TRH gene expression by thyroid hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Functional Anatomy of the Hypothalamus, Ciba Found Symp.*, 168:144-58; discussion 158-64.
358. Lechan, R.M., Toni, R. (2003): Functional anatomy of the hypothalamus and pituitary. In: Besser M, ed. *Endotext.com*.

359. Lee, C.Y., Chung, C.S., Simmen, F.A. (1993): Ontogeny of the porcine insulin-like growth factor system. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 93, 71–80.
360. Lee, C.Z., Head, H.H., Feinstein, C.R., Hazen, J., Simmen, F.A. (1995): Endocrine changes and circulating insulin-like growth factors in newborn calves fed colostrum, milk or milk replacer. *AJAS*, 8 (1) 51-58.
361. Lee, S.L., Stewart, K., Goodman, R.H. (1988): Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone *J Biol Chem.*, 15;263(32):16604-9.
362. Legradi, G., Lechan, R.M. (1998): The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 139:3262–3270.
363. Legradi, G., Lechan, R.M. (1999): Agouti-related protein (AGRP) containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 140: 3643-52.
364. Lelbach, A., Muzes, G., Feher, J. (2005): The insulin-like growth factor system: IGFs, IGF-binding proteins and IGFBP-proteases. *Acta Physiol. Hung.*, 92(2):97-107.
365. Lents, C.A., Wettemann, R.P., Looper, M.L., Bossis, I., Spicer, L.J., Vizcarra, J.A. (1998): Concentrations of GH, IGF-I, Insulin, and Glucose in Postnatal Beef Calves. *Animal Science Research Report*, 215-222.
366. Leonard, J.L., Rosenberg, I.N. (1980): Iodothyronine 50-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and the 50-deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology.*, 107(5):1376–1383.
367. Levy, O., De la Vieja, A., Carrasco, N. (1998): The Na⁺/I⁻ symporter (NIS): Recent advances. *J. Bioenerg. Biomemb.*, 30:195-206.
368. Lewis, B.M., Dieguez, C., Lewis, M., Hall, R., Scanlon, M.F. (1986): Hypothalamic D2 receptors mediate the preferential release of somatostatin-28 in response to dopaminergic stimulation. *Endocrinology.* 119(4):1712-7.
369. Lewis, B.M., Dieguez, C., Lewis, M.D., Scanlon, M.F. (1987): Dopamine stimulates release of thyrotrophin-releasing hormone from perfused intact rat hypothalamus via hypothalamic D2 receptors. *J. Endocrinol.*, 115(3):419-24..
370. Liao, H.T., Pierce, J.G. (1971): The primary structure of bovine Thyrotropin. *The J. Biol. Chem.*, 246 (4) 25, 850-865.

371. Liggins, G.C. (1994): The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reprod Fertil Dev.*, 6(2):141-50.
372. Lin, J.Y., Hwu-Liaw, S.E., Chang, T.C. (1989): Thyroxine may decrease serum thyroxine-binding globulin levels. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi.*, 88(4):342-5.
373. Lo, H.C., Tsao, L.Y., Hsu, W.Y., Chi, C.Y., Tsai, F.A. (2005): Changes in serum insulinlike growth factors, not leptin, are associated with postnatal weight gain in preterm neonates JPEN. *J Parenter Enteral Nutr.*, 29: 87–92.
374. Long, L.M., Schafer, D.W. (2013): Sex effects on plasma leptin concentrations in newborn and postnatal beef calves. *The Professional Animal Scientist*, 29:601–605.
375. LoPresti, J.S., Eigen, A., Kaptein, E., Anderson, K.P., Spencer, C.A., Nicoloff, J.T. (1989): Alterations in 3,3050-triiodothyronine metabolism in response to propylthiouracil, dexamethasone, and thyroxine administration in man. *Journal of Clinical Investigation*, 84(5):1650-6.
376. Luo, L.G., Bruhn, T., Jackson, I.M.(1995): Glucocorticoids stimulate thyrotropin-releasing hormone gene expression in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology*, 1995 Nov;136(11):4945-50.
377. Magner, J.A. (1990): Thyroid stimulating hormone: Biosynthesis, cell biology, and bioactivity, *Endoc. Rev.*, 11(2):354-85.
378. Magner, J.A., Weintraub, B.D., (1982): Thyroid-stimulating hormone subunit processing and combination in microsomal subfractions of mouse pituitary tumor. *J. Biol. Chem.*, 25;257(12):6709-15..
379. Magnusson, R.P., Chazenbalk, G.D., Gestautas, J., Seto, P., Filetti, S., DeGroot, L.J. (1987): Rapoport B. Molecular cloning of the complementary deoxyribonucleic acid for human thyroid peroxidase. *Mol Endocrinol.*, 1(11):856-61.
380. Maia, A.L., Goemann, I.M., Meyer, E.L., Wajner, S.M. (2011): Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J Endocrinol.* 209(3):283-97.
381. Mandel, J.S., I., Cooper, S.,D., (2001): The Use of Antithyroid Drugs in Pregnancy and Lactation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 0021-972X/01

382. Manna, D., Roy, G., Muges, G. (2013): Antithyroid drugs and their analogues: synthesis, structure, and mechanism of action. *Acc Chem Res.*, 19;46(11):2706-15
383. Mansourian, A.R. (2011): Metabolic pathways of tetraiodothyronine and triiodothyronine production by thyroid gland: a review of articles. *Pak J. Biol. Sci.*, 1;14(1):1-12.
384. Marchant, B., Brownlie, B.E., Hart, D.M., Horton, P.W., Alexander, W.D. (1977): The placental transfer of propylthiouracil, methimazole, and carbimazole. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45:1187–1193.
385. Marcus, C., Ehrén, H., Bolme, P., Arner, P. (1988): Regulation of lipolysis during the neonatal period. Importance of thyrotropin. *J. Clin. Invest.*, 82(5):1793-7.
386. Marinò, M., Chiovato, L., Mitsiades, N., Latrofa, F., Andrews, D., Tseleni-Balafouta, S., Collins, A.B., Pinchera, A., McCluskey, R.T. (2000c): Circulating thyroglobulin transcytosed by thyroid cells in complexed with secretory components of its endocytic receptor megalin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85(9):3458-67.
387. Marinò, M., McCluskey, R.T. (2000a): Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 279(5):C1295-306.
388. Marino, M., Zheng, G., Chiovato, L., Pinchera, A., Brown, D., Andrew, D., McCluskey, T.R. (2000b): Role of Megalin (gp330) in Transcytosis of Thyroglobulin by Thyroid Cells *J Biol Chem.*, 10;275(10):7125-37.
389. Marsili, A., Zavacki, A.M., Harney, J.W., Larsen, P.R., (2011): Physiological role and regulation of iodothyronine deiodinases: a 2011 update. *Endocrinol Invest.* 34(5): 395–407
390. Martinez, B., Soñanez-Organis, J.G., Vázquez-Medina, J.P., Viscarra, J.A., MacKenzie, D.S., Crocker, D.E., Ortiz, R.M. (2013): Prolonged food deprivation increases mRNA expression of deiodinase 1 and 2, and thyroid hormone receptor β -1 in a fasting-adapted mammal. *J. Exp. Biol.* 216(24):4647-54.
391. Marx, D.B., Stott, G.D. (1979): Analysis of censored data for such as colostrum immunoglobulin transfer in calves. *J. Dairy Sci.*, 53, 358-62.

392. Matsuo, K., Yamashita, S., Niwa, M., Kurihara, M., Harakawa, S., Izumi, M., Nagataki, S., Melmed, S. (1990) Thyroid hormone regulates rat pituitary insulin-like growth factor-I receptors. *Endocrinology.*, 126(1):550-4.
393. Matsuo, R., Mirecki-Garrido, M., Bocos, C., Henríquez-Hernández, L.A., Kahlon, N., Herrera, E., Norstedt, G., Parini, P., Flores-Morales, A., Fernández-Pérez, L. (2012): Influence of neonatal hypothyroidism on hepatic gene expression and lipid metabolism in adulthood. *PLoS One.*, 7(5):e37386.
394. Matsushita, A., Sasaki, S., Kashiwabara, Y., Nagayama, K., Ohba, K., Iwaki, H., Misawa, H., Ishizuka, K., Nakamura, H. (2007): Essential role of GATA2 in the negative regulation of thyrotropin beta gene by thyroid hormone and its receptors. *Mol. Endocrinol.*, 21, 865-884.
395. Matte, J.J., Girard, C.L., Seoane, J.R., Brisson, G.J. (1982): Absorption of colostral immunoglobulin G in the newborn dairy calf. *J. Dairy Sci.* 65: 1765-1770
396. McCammon, M.G., Scott, D.J., Keetch, C.A., Greene, L.H., Purkey, H.E., Petrassi, H.M., Kelly, J.W., Robinson, C.V. (2002): Screening transthyretin amyloid fibril inhibitors: characterization of novel multiprotein, multiligand complexes by mass spectrometry. *Structure.*, 10(6):851-63.
397. McCoy, M.A., Smyth, J.A., Elis, W.A., Artur, J.R., Kennedy, D.G. (1997): Experimental reproduction of iodine deficiency in cattle, *Vet. Rec.*, 141:544-7.
398. McDowell, L.R. (2003): *Minerals in Animal and Human Nutrition* (Second Edition). Elsevier Science B.V., 305-334.
399. McGuire, M.A., Dwyer, D.A., Harrell, R.J., Bauman, D.E. (1995): Insulin regulates circulating insulin-like growth factors and some of their binding proteins in lactating cows. *AmJPhysiol* 269:E723–30.
400. McIntosh, G.H., Potter, B.J., Mano, M.T., Hua, C.H., Cragg, B.G., Hetzel, B.S. (1983): The effect of maternal and fetal thyroidectomy on fetal brain development in the sheep. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 9(3):215-23.
401. Mendel, C.M., Weisinger, R.A., Jones, A.L., Cavalieri, R.R. (1987): Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: A perfused rat liver study. *Endocrinology* 120:1742-1749

402. Mengistu M1, Lukes YG, Nagy EV, Burch HB, Carr FE, Lahiri S, Burman KD. 1994 TSH receptor gene expression in retroocular fibroblasts. *J Endocrinol Invest*;17(6):437-41.
403. Mesiano, S., Young, I.R., Hey, A.W., Browne, C.A., Thorburn, G.D. (1989): Hypophysectomy of the fetal lamb leads to a fall in the plasma concentration of insulin-like growth factor I (IGF-I), but not IGF-II. *Endocrinology.*, 124(3):1485-91.
404. Mihály, E., Fekete, C., Légrádi, G., Lechan, R.M. (2001): Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res.*, 9;891(1-2):20-31
405. Miller, J.K., Ramsey, N., Madsen, F.C. (1988): The trace elements. In: *The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition.* (ed. D.C. Church), Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, Inc 342– 400.
406. Mitsuma, T., Nogimori, T. (1982): Effects of dexamethasone on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in rats. *Acta Endocrinol. (Copenh)*.100(1):51-6.
407. Mitsuma, T., Rhue, N., Sobue, G., Hirooka, Y., Kayama, M., Yokoi, Y., Adachi, K., Nogimori, T., Sakai, J., Sugie, I.I. (1995): Distribution of thyrotropin releasing hormone receptor in rats: an immunohistochemical study. *Endocr Regul.*, 29(3):129-134.
408. Mohan, S., Baylink, D.J. (2002): IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J. Endocrinol.*, 175(1):19-31.
409. Momotani, N., Noh J.Y., Ishikawa, N., Ito, K. (1997): Effects of propylthiouracil and methimazole on fetal thyroid status in mothers with Graves' hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:3633-6.
410. Moreno, J.C., Bikker, H., Kempers, M.J., van Trotsenburg, A.S., Baas, F., de Vijlder, J.J., Vulsma, T., Ris-Stalpers, C. (2002): Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.*, 347: 95–102.
411. Moreno, M., Berry, M.J., Horst, C., Thoma, R., Goglia, F., Harney, J.W., Larsen, P.R., Visser, T.J. (1994): Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. *FEBS Lett* 344:143–146.

412. Morinaga, Y., Osame, S., Sarashina, T., Ichijo, S. (1990) Clinicopathological observations on calves with enzootic goiter. *Nihon Juigaku Zasshi.*;52(6):1309-11
413. Mortimer, R.,H, Cannell, G.,R, Addison, R.,S, Johnson L.,P, Roberts, M.,S, Bernus, I. (1997): Methimazole and propylthiouracil equally cross the perfused human term placental lobule. *J Clin Endocrinol Metab.*, 82(9):3099-102.
414. Mory, G., Bouillaud, F., Combes-George, M., Ricquier, D. (1984): Noradrenaline Controls the Concentration of the Uncoupling Protein in Brown Adipose Tissue. *e65 166,393-396.*
415. Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T., Cone, R.D. (1992): The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*, 257: 1248-51.
416. Mueller, S., Kleinau, G., Szkudlinski, M.W., Jaeschke, H., Krause, G., Paschke, R. (2009): The superagonistic activity of bovine thyroid-stimulating hormone (TSH) and the human TR1401 TSH analog is determined by specific amino acids in the hinge region of the human TSH receptor. *J. Biol. Chem.*, 12;284(24):16317-24.
417. Muñoz, A., Bernal, J. (1997): Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur. J. Endocrinol.*, 137(5):433-45.
418. Murakami, M., Kamiya, Y., Morimura, T., Araki, O., Imamura, M., Ogiwara, T., Mizuma, H., Mori, M. (2001): Thyrotropin receptors in brown adipose tissue: thyrotropin stimulates type II iodothyronine deiodinase and uncoupling protein-1 in brown adipocytes. *Endocrinology.*, 142(3):1195-201.
419. Murata, Y., Magner, J.A., Refetoff, S. (1986): The role of glycosylation in the molecular conformation and secretion of thyroxine-binding globulin. *Endocrinology.*, 118(4):1614-21.
420. Muscella, A., Marsigliante, S., Verri, T., Urso, L., Dimitri, C., Bottà, G., Paulmichl, M., Beck-Peccoz, P., Fugazzola, L., Storelli, C. (2008): PKC-epsilon-dependent cytosol-to-membrane translocation of pendrin in rat thyroid PC Cl3 cells. *J. Cell. Physiol.*, 217(1):103-12.
421. Mutinati, M., Desantis, S., Rizzo, A., Zizza, S., Ventriglia, G., Pantaleo, M., Sciorsci, R.L. (2010): Localization of thyrotropin receptor and thyroglobulin in the bovine corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.*, 118(1):1-6.

422. Naaman Répérant, E., Durand, P. (1997): The development of the ovine fetal adrenal gland and its regulation. *Reprod Nutr Dev.*, 37(1):81-95.
423. Nagasaki, H., Wang, Z., Jackson, V.R., Lin, S., Nothacker, H.P., Civelli, O. (2006): Differential expression of the thyrostimulin subunits, glycoprotein alpha2 and beta5 in the rat pituitary. *J. Mol. Endocrinol.*, 37(1):39-50.
424. Nagayama, Y., Namba, H., Yokoyama, N., Yamashita, S., Niwa, M. (1998): Role of asparagine-linked oligosaccharides in protein folding, membrane targetting, and thyrotropin and autoantibody binding of the human thyrotropin receptor. *J.Biol.Chem.* 273(50):33423-8.
425. Nagayama, Y., Yamashita, S., Hirayu, H., Izumi, M., Uga, T., Ishikawa, N., Ito, K., Nagataki, S. (1989): Regulation of thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression by thyrotropin in cultured human thyroid cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 68(6):1155-9.
426. Nagy, O., Tóthová, C., Nagyová, V., Kováč, G., Pošivák J. (2014): Changes in the serum protein electrophoretic pattern in lambs during the first month of life. *Acta vet.Brno* 83: 187-193
427. Nakabayashi, K., Matsumi, H., Bhalla, A., Bae, J., Mosselman, S., Hsu, S.Y., Hsueh, A.J. (2002): Thyrostimulin, a heterodimer of two new human glycoprotein hormone subunits, activates the thyroid-stimulating hormone receptor. *J. Clin. Invest.*, 109(11):1445-52.
428. Nántö-Salonen, K., Glasscock, G.F., Rosenfeld, R.G.(1991): The effects of thyroid hormone on insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) expression in the neonatal rat: prolonged high expression of IGFBP-2 in methimazole-induced congenital hypothyroidism. *Endocrinology*, 129(5):2563-70.
429. Nántö-Salonen, K., Muller, H.L., Hoffman, A.R., Vu, T.H., Rosenfeld, R.G. (1993): Mechanisms of thyroid hormone action on the insulin-like growth factor system: all thyroid hormone effects are not growth hormone mediated. *Endocrinology.*, 132(2):781-8.
430. Nántö-Salonen, K., Rosenfeld, R.G. (1992): Insulin-like growth factor binding protein expression in the hypothyroid rat is age dependent. *Endocrinology.*, 131(3):1489-96.

431. Naylor, S.L., Chin, W.W., Goodman, H.M., Lalley, P.A., Grzeschik, K.H., Sakaguchi, A.Y. (1983): Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse. *Somatic. Cell. Genet.*, 9, 757-770.
432. Nicholls, T.J., Follett, B.K., Goldsmith, A.R., Pearson, H. (1988): Possible homologies between photorefractoriness in sheep and birds: the effect of thyroidectomy on the length of the ewe's breeding season. *Reproduction Nutrition Development*, 28, 375–385.
433. Nicol, F., Lefranc, H., Arthur, J.R., Trayhurn, P. (1994): Characterization and postnatal development of 5'-deiodinase activity in goat perirenal fat. *Am J Physiol.*, 267:R144-9.
434. Nielsen, T.B., Ferdows, M.S., Brinkley, B.R., Field, J.B. (1985): Morphological and biochemical responses of cultured thyroid cells to thyrotropin. *Endocrinology*. 116(2):788-97.
435. Nikolić, J.A., Kulesar, M., Kátai, L., Nedić, O., Jánosi, S., Huszenicza, G. (2003): Periparturient endocrine and metabolic changes in healthy cows and cows affected with mastitis, *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 50, 22-9.
436. Nikolić, J.A., Begović, J., Resanović, J., Danković, I., Filipović, S. (1996): Serum hormones and insulin like growth factor-I in male and female calves and their possible relation to growth. *Acta Vet Beograd*, 46. 17-26
437. Nikolić, J.A., Nedić O., Gavrović, M., Stojanović, D., Živković, B. (1998): Different serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding characteristics accompany reduced growth associated with low thyroid hormone and/or low total IGF-I status in young pigs, *Acta Veterinaria*, 48, 3-18.
438. Nikolić, J.A., Ratković, M., Nedić, O. (1996): Determination of insulin-like growth factor – I by radioimmunoassay. *J. Serb. Chem. Soc.*, 61, 1149-1157.
439. Nikrodhanond, A.A., Ortiga-Carvalho, T.M., Shibusawa, N., Hashimoto, K., Liao, X.H. Refetoff, S., Yamada, M., Mori, M., Wondisford F E. (2006): Dominant Role of Thyrotropin-releasing Hormone in the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in *The journal of biological chemistry*, 281: 8, 5000–5007.
440. Nillni, E.A., Sevarino, K.A. (1999): The biology of prothyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocr Rev.*, 20:599–648.

441. Nishii, Y., Hashizume, K., Ichikawa, K., Takeda, T., Kobayashi, M., Nagasawa, T., Katai, M., Kobayashi, H., Sakurai, A. (1993): Induction of cytosolic triiodo-L-thyronine (T3) binding protein (CTBP) by T3 in primary cultured rat hepatocytes. *Endocr J.*, 40(4):399-404.
442. Nixon, D.A., Akasha, M.A., Anderson, R.R. (1988): Free and total thyroid hormones in serum of Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 71(5):1152-60.
443. Nowak, K.W., Kaczmarek, P., Mackowiak, P., Ziolkowska, A., Albertin, G., Ginda, W.J., Trejter, M., Nussdorfer, G.G., Malendowicz, L.K. (2002): Rat thyroid gland expresses the long form of leptin receptors, and leptin stimulates the function of the gland in euthyroid non-fasted animals. *Int. J. Mol. Med.*, 9(1):31-4.
444. Nussbaum, A., Schiessler, G., Hammon, H.M., Blum, J.W. (2002): Growth performance and metabolic and endocrine traits in calves pair-fed by bucket or by automate starting in the neonatal period. *J. Anim. Sci.*, 80(6):1545-55.
445. Oba, K., Kimura, S. (1980): Effects of vitamin A deficiency on thyroid function and serum thyroxine levels in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 26, 327–334.
446. Ohguchi, H., Tanaka, T., Uchida, A., Magoori, K., Kudo, H., Kim, I., Daigo, K., Sakakibara, I., Okamura, M., Harigae, H. (2008): Hepatocyte nuclear factor 4alpha contributes to thyroid hormone homeostasis by cooperatively regulating the type 1 iodothyronine deiodinase gene with GATA4 and Kruppel-like transcription factor 9. *Molecular and Cellular Biology*, 28 3917–3931.
447. Ohlsson, C., Mohan, S., Sjögren, K., Tivesten Isgaard, J., Isaksson, O., Jansson, J.O., Svensson, J. (2009): The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev.*, 30:494–535.
448. Ohtaki, S., Nakagawa, H., Kimura, S., Yamazaki, I. (1981): Analyses of catalytic intermediates of hog thyroid peroxidase during its iodinating reaction. *J. Biol. Chem.* 256(2):805-810.
449. Okada, S.L., Ellsworth, J.L., Durnam, D.M., Haugen, H.S., Holloway, J.L., Kelley, M.L., Lewis, K.E., Ren, H., Sheppard, P.O., Storey, H.M., Waggle, K.S., Wolf, A.C., Yao, L.Y., Webster, P.J. (2006): A glycoprotein hormone expressed in corticotrophs exhibits unique binding properties on thyroid-stimulating hormone receptor. *Mol. Endocrinol.*, 20(2):414-25.

450. Oliveira, J.H.A, Barbosa, E.R., Kasamatsu, T., Abucham, J., (2007): Evidence for thyroid hormone as a positive regulator of serum thyrotropin bioactivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 92 (8) 3108-3113
451. Oliveira, K.J, Ortiga-Carvalho, T.M., Cabanelas, A., Veiga, M.A., Aoki, K., Ohki-Hamazaki, H., Wada, K., Wada, E., Pazos-Moura, C.C. (2006): Disruption of neuromedin B receptor gene results in dysregulation of the pituitary-thyroid axis. *J. Mol. Endocrinol.*, 36(1):73-80.
452. Oliver, M.H., Harding, J.E., Breier, B.H., Gluckman, P.D. (1996): Fetal insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II are regulated differently by glucose or insulin in the sheep fetus *Reprod Fertil Dev.*, 8(1):167-72.
453. Oltner, R., Berglund, B. (1982): Blood levels of haemoglobin, leukocytes, glucose, urea, creatinin, calcium, magnesium and inorganic phosphorus in dairy calves from birth to 12 weeks of age, *Swedish J Agr Res*, 12, 23-8.
454. Ontsouka, E.C., Zbinden, Y., Hammon, H.M., Blum, J.W. (2006): Ontogenesis of mRNA levels and binding sites of hepatic α -adrenoceptors in young cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 30:170–184.
455. Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., (1997): Molecular basis of thyroid hormonedependent brain development. *Endocr. Rev.*, 18, 462–475.
456. Ortiga-Carvalho, T.M., Oliveira, K.J., Soares, B.A., Pazos-Moura, C.C., (2002): The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: In vivo and in vitro studies, *J. Endocrinol.*, 174 121-125.
457. Osgerby, J.C., Wathes, D.C., Howard, D., Gadd, T.S. (2002): The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *J. Endocrinol.*, 173(1):131-41.
458. Osorio, J.S., Trevisi, E., Ballou, M.A., Bertoni, G., Drackley, J.K., Loor, J.J.(2013) Effect of the level of maternal energy intake prepartum on immunometabolic markers, polymorphonuclear leukocyte function, and neutrophil gene network expression in neonatal Holstein heifer calves. *J Dairy Sci.*96(6):3573-87.
459. Otten, M.H., Mol, J.A., Visser, T.J. (1983): Sulfation preceding deiodination of iodothyronines in rat hepatocytes. *Science* 221 81–83.

460. Ottosson, M., Vikman-Adolfsson, K., Enerbäck, S., Olivecrona, G., Björntorp, P. (1994): The effects of cortisol on the regulation of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 79(3):820-5.
461. Pácha, J. (2000): Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev* 80:1633–67.
462. Pallud, S., Ramaugé, M., Gavaret, J.M., Lennon, A.M., Munsch, N., St Germain, D.L., Pierre, M., Courtin, F. (1999): Regulation of type 3 iodothyronine deiodinase expression in cultured rat astrocytes: role of the Erk cascade. *Endocrinology.* 140(6):2917-23.
463. Park, E.A., Song, S., Olive, M., Roesler, W.J. (1997): CCAAT-enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) is required for the thyroid hormone but not the retinoic acid induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene transcription. *Biochem J.*, 15;322 (Pt 1):343-9.
464. Parkinson, T.J., Follett, B.K. (1994): Effect of thyroidectomy upon seasonality in rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 51–58.
465. Patel, J., Landers, K., Li, H., Mortimer, R.H., Richard, K. (2011): Thyroid hormones and fetal neurological development. *J Endocrinol* 209:1–8
466. Patel, Y.C. (1999): Somatostatin and its receptor family *Front Neuroendocrinol.* 20(3):157-98.
467. Paulikova, I., Seidel, H., Nagy, O., Tothova, C., Kovač, G. (2011): Concentration of Thyroid hormones in various ages categories of ruminants and swine, *Acta Veterinaria*, 61, 5-6, 489-503.
468. Pavelić, J., Matijević, T., Knezević, J. (2007): Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J. Med. Res.* 125(4):511-22.
469. Peckett, A.J., Wright, D.C., Riddell, M.C. (2011): The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism.*;60(11):1500-10.
470. Pekary, A.E., Berg, L., Santini, F., Chopra, I., Hershman, J.M. (1994): Cytokines modulate type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, 101(1-2):R31-5.
471. Penel, C., Gruffat, D., Alquier, C., Benoliel, A.M., Chabaud, O. (1998): Thyrotropin chronically regulates the pool of thyroperoxidase and its intracellular

- distribution: a quantitative confocal microscopic study. *J. Cell. Physiol.*, 174(2):160-9.
472. Perello, M., Friedman, T., Paez-Espinosa, V., Shen, X., Stuart, R.C., Nillni, E.A. (2006): Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*, 147:2705–2716.
473. Perello, M., Nillni, E.A. (2007): The biosynthesis and processing of neuropeptides: lessons from prothyrotropin releasing hormone (proTRH). *Front. Biosci.*, 12:3554–65.
474. Perello, M., Stuart, R.C., Vaslet, C.A., Nillni, E.A. (2007): Cold exposure increases the biosynthesis and proteolytic processing of prothyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus via beta-adrenoreceptors. *Endocrinology*, 148(10):4952-64.
475. Persani, L. (1998): Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin biological activity. *Thyroid.*, 8(10):941-6.
476. Peter, A.T. (2013): Bovine placenta: a review on morphology, components and defects from terminology and clinical perspective, *Theriogenology.*, 15;80(7):693-705.
477. Peters, J.R., Foord, S.M., Dieguez, C., Scanlon, M.F., Hall, R. (1983): Alpha 1-adrenoreceptors on intact rat anterior pituitary cells: correlation with adrenergic stimulation of thyrotropin secretion. *Endocrinology*. 113(1):133-40.
478. Pethick, D.W., Dunshea, F.R. (1993): Fat metabolism and turnover, in: Forbes J.M., France J. (Eds.), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 291-3111.
479. Pfaffl, M.W., Georgieva, T.M., Georgiev, I.P., Ontsouka, E., Hageleit, M., Blum, J.W. (2002): Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest Anim Endocrinol.*, 22(2):91-102.
480. Pierce, J.G., Parsons, T.F. (1981): Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.*, 50: 465–495.

481. Pinotti, L., Rosi, F. (2006): Leptin in bovine colostrum and milk. *Horm. Metab. Res.*, 38(2):89-93.
482. Ponsin, G., Mornex, R. (1983): Control of thyrotropin glycosylation in normal rat pituitary cells in culture: effect of thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 113(2):549-56.
483. Prummel, M.F., Brokken, L.J. S., Mesuri, G., Misrahi, M., Bakker, O., Wiersinga, W.M. (2000): Expression of the Thyroid-Stimulating Hormone Receptor in the Folliculo-Stellate Cells of the Human Anterior Pituitary. *J. Clin. Endocrinol Metabolism*, 85(11):4347-53
484. Prummel, M.F., Brokken, L.J., Wiersinga, W.M. (2004): Ultra short-loop feedback control of thyrotropin secretion *Thyroid*. 14(10):825-9.
485. Puls, R. (1988): *Mineral Levels in Animal Health*. Sherpa International, Clearbrook, B.C., Canada.
486. Quezada-Tristán, T., García-Flor, V.L., Ortiz-Martínez, R., Arredondo-Figueroa, J.L., Medina-Esparza, L.E., Valdivia-Flores, A.G., Montoya-Navarrete, A.L. (2014): Biochemical parameters in the blood of Holstein calves given immunoglobulin Y-supplemented colostrums. *BMC Vet. Res.*, 14;10:159.
487. Quigley, J.D., Kost, C.J., Wolfe, T.M. (2002): Absorption of Protein and IgG in Calves Fed a Colostrum Supplement or Replacer *J Dairy Sci.* 85(5):1243-8.
488. Raad, H., Eskalli, Z., Corvilain, B., Miot, F., De Deken, X. (2013): Thyroid hydrogen peroxide production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOXA2. *Free Radic. Biol. Med.*, 56:216-25.
489. Radcliff, R.P., Lookingland, K.J., McMahon, C.D., Chapin, L.T., Tucker, H.A. (2003): Thyrotropin-releasing hormone mediates serotonin-induced secretion of GH in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 24(2):137-53.
490. Radian, S., Coculescu, M., Morris, J.F. (2003): Somatotroph to thyrotroph cell transdifferentiation during experimental hypothyroidism - a light and electron-microscopy study. *J. Cell Mol. Med.*, 7(3):297-306.
491. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007): *Veterinary medicine* 10th edition, 149-150 Elsevier Ltd.

492. Radunović, N., Dumez, Y., Nastić, D., Mandelbrot, L., Dommergues, M. (1991): Thyroid function in fetus and mother during the second half of normal pregnancy. *Biol Neonate.*, 59(3):139-48.
493. Radwanska, P., Kosior-Korzecka, U. (2014): Effect of leptin on thyroid-stimulating hormone secretion and nitric oxide release from pituitary cells of ewe lambs in vitro. *J. Physiol. Pharmacol.*, 65(1):145-51.
494. Rajaram, S., Baylink, D.J., Mohan, S. (1997) Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids:regulation and functions. *Endocr Rev* 18: 801–831.
495. Ramos, S., Goya, L., Alvarez, C., Martín, M.A., Pascual-Leone, A.M. (2001): Effect of thyroxine administration on the IGF/IGF binding protein system in neonatal and adult thyroidectomized rats. *J Endocrinol.*, 169(1):111-22.
496. Ramos, S., Goya, L., Alvarez, C., Pascual-Leone, A.M. (1998): Mechanism of hypothyroidism action on insulin-like growth factor-I and -II from neonatal to adult rats: insulin mediates thyroid hormone effects in the neonatal period. *Endocrinology.*, 139(12):4782-92.
497. Ramos, S., Goya, L., Martín, M.A., Escrivá, F., Pascual-Leone, A.M. (2002): Influence of hypothyroidism on circulating concentrations and liver expression of IGF-binding proteins mRNA from neonatal and adult rats. *J Endocrinol.*, 172(2):363-73.
498. Rapoport, B., Chazenbalk, G.D., Jaume, J.C., McLachlan, S.M. (1998): The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr. Rev.*, 19(6):673-716.
499. Rastogi, M.V., LaFranchi, S.H. (2010): Congenital hypothyroidism. *Rastogi and LaFranchi Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5:17.
500. Rauprich, A. B., Hammon H.M., Blum, J.W. (2000): Influence of feeding different amounts of first colostrum on metabolic, endocrine, and health status and on growth performance in neonatal calves. *Journal of Animal Science*, 78, 896–908.
501. Rausch, M. I., Tripp, M.W., Govoni, K.E., Zang, W., Weber, W.J., Crooker, B.A., Hoagland, T.A., Zinn, S.A. (2002): The influence of level of feeding on growth and serum insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding

- proteins in growing beef cattle supplemented with somatotropin. *J. Anim. Sci.*, 80:94–100.
502. Rawitch, A.B., Pollock, G., Yang, S.X., Taurog, A. (1992): Thyroid peroxidase glycosylation: the location and nature of the N-linked oligosaccharide units in porcine thyroid peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 297(2):321-7.
503. Refetoff, S. (2012): Thyroid Hormone Serum Transport Proteins: Structure, Properties, Genes and Transcriptional regulation. Last Updated: March 1, 2012. Available at: <http://www.thyroidmanager.org/chapter/thyroid-hormone-serum-transport-proteins-2>
504. Renaville, R., Hammadi, M., Portetelle, D. (2002): Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol.*, 23(1-2):351-60.
505. Ribeiro, M.O., Bianco, S.D.C., Kaneshige, M. (2010): Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor- β isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*, 151 (1): 432–440.
506. Ridgway, E.C., Klibanski, A., Martorana, M.A., Milbury, P., Kieffer, J.D., Chin, W.W. (1983): The effect of somatostatin on the release of thyrotropin and its subunits from bovine anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology*, 112(6):1937-42.
507. Ridgway, E.C., Weintraub, B.D., Maloof, F. (1974): Metabolic clearance and production rates of human thyrotropin. *J. Clin. Invest.*, 53 895-903.
508. Riedel, C., Levy, O., Carrasco, N. (2001): Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J. Biol. Chem.*, 276:21458–21463.
509. Riskind, P.N., Kolodny, J.M., Larsen, P.R. (1987): The regional hypothalamic distribution of type II 5'- monodeiodinase in euthyroid and hypothyroid rats. *Brain Res.*, 420:194–198.
510. Riviere, J.E., Papich, M.G. (2009): *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* Ninth Edition. Wiley-Blackwell, 762-764.
511. Rizos, C.V., Elisaf, M.S., Liberopoulos E.N. (2011): Effects of Thyroid Dysfunction on Lipid Profile. *Open Cardiovasc Med J.*, 5: 76–84.
512. Robbins, J., Rall, J. E., Gorden, P. (1980): In: *Metabolic Control and Disease*. Bondy P K, Rosenberg L E, editors. Philadelphia: Saunders; 1325–1426.

513. Roberson, M.S., Schoderbek, W.E., Tremml, G., Maurer, R.A. (1994): Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 29:2985-2993.
514. Robinson, R.S., Mann, G.E., Gadd, T.S., Lamming, G.E., Wathes, D.C. (2000): The expression of the IGF system in the bovine uterus throughout the oestrous cycle and early pregnancy. *J Endocrinol.* 165(2):231-43.
515. Rocha, T.G., Nociti P.R., Sampaio, A.A.M., Fagliari, J.J., (2012): Passive immunity transfer and serum constituents of crossbred calves. *Pesq. Vet. Bras.* 32(6):515-522
516. Rodriguez, E.M., Blazquez, J.L., Pastor, F.E., Pelaez, B., Pena, P., Peruzzo, B., Amat, P. (2005): Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol.* 247:89–164.
517. Rodriguez-Arno, J., Miell, J., Thomas, M., McGregor, A.M., Ross, R.J. (1994): Changes in hepatic insulin-like growth factor-binding proteins -1, -2 and -3 mRNA levels in rats with altered thyroid status. *J. Endocrinol.* 140(2):251-5.
518. Roffler, B., Fäh, A., Sauter, S.N., Hammon, H.M., Gallmann, P., Brem, G., Blum, J.W. (2003): Intestinal morphology, epithelial cell proliferation, and absorptive capacity in neonatal calves fed milk-born insulin-like growth factor-I or a colostrum extract. *J Dairy Sci.*, 86(5):1797-806.
519. Rousset, B., Mornex, R. (1991): The thyroid hormone secretory pathway-current dogmas and alternative hypotheses. *Mol Cell Endocrinol.*, 78:89–93.
520. Rudas, P., Rónai, Z., Bartha, T. (2005): Thyroid hormone metabolism in the brain of domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.*, 29(1):88-96.
521. Rumsey, T.S., Bitman, J., Tao, H., Kozak, A.S. (1985): Changes in plasma concentrations of thyroxine and triiodothyronine in beef steers fed different levels of propylthiouracil. *J. Anim. Sci.*, 60:1454-1462.
522. Sagar, G.D., Gereben, B., Callebaut, I., Mornon, J.P., Zeold, A., Curcio-Morelli, C., Harney, J.W., Luongo, C., Mulcahey, M.A., Larsen, P.R. (2008): The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer. *Molecular Endocrinology*, 22 1382–1393.
523. Sagar, G.D., Gereben, B., Callebaut, I., Mornon, J.P., Zeöld, A., da Silva, W.S., Luongo, C., Dentice, M., Tente, S.M., Freitas, B.C., Harney, J.W., Zavacki, A.M.,

- Bianco, A.C. (2007): Ubiquitination-induced conformational change within the deiodinase dimer is a switch regulating enzyme activity. *Mol. Cell. Biol.*, 27:4774–4783.
524. Salvatore, D., Bartha, T., Harney, J.W., Larsen, P.R. (1996): Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology*, 137:3308–331.
525. Salvatore, D., Low, S.C., Berry, M., Maia, A.L., Harney, J.W., Croteau, W., St.Germain, D.L., Larsen, P.R. (1995): Type 3 lodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *Journal of Clinical Investigation*, 96 2421–2430.
526. Salvatore, D., Tu, H., Harney, J.W., Larsen, P.R. (1996) : Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid *J. Clin. Invest.*, 15;98(4):962-8.
527. Sam, S., Frohman, L.A. (2008): Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation in *Endocrinology and metabolism, Clinics of North America*, 37:1, 1–22.
528. Samuels, M.H., Wierman, M.E., Wang, C., Ridgway, E.C. (1989): The effect of altered thyroid status on pituitary hormone messengerribonucleic acid concentration in the rat. *Endocrinology* 124:2277-2282.
529. Sanchez, J.M. (1995): Iodine in bovine nutrition. *Nut. Anim. Tropical*, 2:95. (Dairy Sci. Abst. 59: 1596).
530. Sangild, P.T. (2003): Uptake of Colostral Immunoglobulins by the Compromised Newborn Farm Animal. *Acta vet. scand.Suppl.* 98, 105-122.
531. Santana-Farré, R., Mirecki-Garrido, M., Bocos, C., Henríquez-Hernández, L.A., Kahlon, N., Herrera, E., Norstedt, G., Parini, P., Flores-Morales, A., Fernández-Pérez, L. (2012): Influence of neonatal hypothyroidism on hepatic gene expression and lipid metabolism in adulthood. *PLoS One.*, 7(5):e37386.
532. Sarapura, V.D., Strouth, H.L., Wood, W.M., Gordon, D.F., Ridgway, E.C. (1998): Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene promoter in thyrotropes *Mol. Cell Endocrinol.*, 25;146(1-2):77-86.
533. Sauter, S.N., Ontsouka, E., Roffler, B., Zbinden, Y., Philipona, C., Pfaffl, M., Breier, B.H., Blum, J.W., Hammon, H.M.(2003): Effects of dexamethasone and

- colostrum intake on the somatotropic axis in neonatal calves. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285(2):E252-61.
534. Savić B., Đ. (2012): Uticaj peripartalne aplikacije Propiltiouracila na endokrini i metabolički status junica Holštajn rase, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Veterinarski fakultet.
535. Savu, L., Vranckx, R., Maya, M., Gripois, D., Blouquit, M.F., Nunez, E.A. (1989): Thyroxine-binding globulin and thyroxine-binding prealbumin in hypothyroid and hyperthyroid developing rats. *Biochim. Biophys. Acta.*, 15;992(3):379-84.
536. Sawchenko, P.E., Swanson, L.W. (1982): The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res. Rev.*, 4:275.
537. Schäff, C.T., Rohrbeck, D., Steinhoff-Wagner, J., Kanitz, E., Sauerwein, H., Bruckmaier, R.M., Hammon, H.M., (2014): Effects of colostrum versus formula feeding on hepatic glucocorticoid and α_1 - and β_2 -adrenergic receptors in neonatal calves and their effect on glucose and lipid metabolism. *J. Dairy Sci.*, 97(10):6344-57.
538. Schäff, C.T., Rohrbeck, D., Steinhoff-Wagner, J., Kanitz, E., Sauerwein, H., Bruckmaier, R.M., Hammon, H.M. (2015): Hepatic glucocorticoid and α_1 - and β_2 -adrenergic receptors in calves change during neonatal maturation and are related to energy regulation. *J Dairy Sci.*, 98(2):1046-56.
539. Scheuer, B.H., Zbinden, Y., Schneiter, P., Tappy, L., Blum, J.W., Hammon, H.M. (2006): Effects of colostrum feeding and glucocorticoid administration on insulin-dependent glucose metabolism in neonatal calves. *Domest Anim Endocrinol.*, 31:227–45.
540. Schmidt, M., Sangild, P.T., Blum, J.W., Andersen, J.B., Greve, T. (2004): Combined ACTH and glucocorticoid treatment improves survival and organ maturation in premature newborn calves. *Theriogenology*, 61:1729–1744.
541. Schmutzler, C., Mentrup, B., Schomburg, L., Hoang-Vu, C., Herzog, V., Köhrle, J. (2007): Selenoproteins of the thyroid gland: expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3. *Biol Chem.*, 388(10):1053-9.

542. Schröder-van der Elst, J. P., van der Heide, D., Morreale de Escobar, G., Obregón, M.J. (1998): Iodothyronine deiodinase activities in fetal rat tissues at several levels of iodine deficiency: a role for the skin in 3,5,3'-triiodothyronine economy? *Endocrinology*, 139(5):2229-34.
543. Scott, P.R., Pennz, C.D., Macrae, A. (2011): *Cattle Medicine*. CRC Press, 263.
544. Segal, J. (1989): A rapid, extranuclear effect of 3,5,3'-triiodothyronine on sugar uptake by several tissues in the rat in vivo. Evidence for a physiological role for the thyroid hormone action at the level of the plasma membrane. *Endocrinology*, 124:2755–2764.
545. Seimiya, Y., Ohshima, K., Itoh, H., Ogasawara, N., Matsukida, Y., Yuita, K. (1991): Epidemiological and pathological studies on congenital diffuse hyperplastic goiter in calves. *J. Vet. Med. Sci.*, 53(6):989-94.
546. Shao, W., Rosenauer, A., Mann, K., Chang, C.P., Rachez, C., Freedman, L.P., Miller, W.H. (2000): Ligand-inducible interaction of the DRIP/TRAP coactivator complex with retinoid receptors in retinoic acid-sensitive and -resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*. 15;96(6):2233-9.
547. Shaw, G.H., Convey, E.M., Tucker, H.A., Reineke, E.P., Thomas, J.W., Byrne, J.J. (1975): Bovine serum thyroxine, prolactin, growth hormone, glucocorticoid, and thyroxine binding globulin response to thyroprotein. *J. Dairy. Sci.*, 58(5):703-8.
548. Shi, Z.X., Levy, A., Lightman, S.L. (1993): Hippocampal input to the hypothalamus inhibits thyrotrophin and thyrotrophin-releasing hormone gene expression, *Neuroendocrinology*, 57(4):576-80.
549. Shimizu, Y., Shimazu, T. (2002): Thyroid hormone augments GLUT4 expression and insulin-sensitive glucose transport system in differentiating rat brown adipocytes in culture *J Vet Med Sci.*, 64(8):677-81.
550. Shupnik, M.A., Ardisson, L.J., Meskell, M.J., Bornstein, J., Ridgway, E.C. (1986): Triiodothyronine (T3) regulation of thyrotropin subunit gene transcription is proportional to T3 nuclear receptor occupancy. *Endocrinology*, 118(1):367-71
551. Shupnik, M.A., Greenspan, S.L., Ridgway, E.C. (1986): Transcriptional regulation of thyrotropin subunit genes by thyrotropin-releasing hormone and dopamine in pituitary cell culture. *J. Biol. Chem.*, 25;261(27):12675-9.

552. Shupnik, M.A., Ridgway, E.C., Chin, W.W. (1989): Molecular biology of thyrotropin. *Endocr. Rev.*, 10:459–475.
553. Shussler, G.C. (2000): The thyroxine-binding proteins. *Thyroid.*, 10(2):141-9.
554. Sibley, C.P., Coan, P.M., Ferguson-Smith, A.C. (2004): Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101:8204-8208.
555. Siegrist-Kaiser, C.A., Juge-Aubry, C., Tranter, M.P., Ekenbarger, D.M., Leonard, J.L. (1990): Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. *J. Biol. Chem.*, 265:5296– 5302.
556. Silva, J.E., Larsen, P.R. (1986): Hormonal regulation of iodothyronine 5' deiodinase in rat brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, 251:E639–E643
557. Silver, M., Fowden, A.L. (1995) Sympathoadrenal and other endocrine and metabolic responses to hypoglycaemia in the fetal foal during late gestation. *Exp Physiol* 80: 651–662, 1995.
558. Silversides, D.W., Houde, A., Ethier, J.F., Lussier, J.G. (1997): Bovine thyrotropin receptor cDNA is characterized by full-length and truncated transcripts. *J. Mol. Endocrinol.*, 18(2):101-12.
559. Simonides, W.S., Mulcahey, M.A., Redout, E.M., Muller, A., Zuidwijk, M.J., Visser, T.J., Wassen, F.W., Crescenzi, A., da-Silva, W.S., Harney, J. (2008): Hypoxia-inducible factor induces local thyroid hormone inactivation during hypoxic-ischemic disease in rats. *Journal of Clinical Investigation*, 118 975–983.
560. Singru, P.S., Fekete, C., Lechan, R.M. (2005): Neuroanatomical evidence for participation of the hypothalamic dorsomedial nucleus (DMN) in regulation of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) by alpha-melanocyte stimulating hormone. *Brain research.*, 1064, 42-51.
561. Sinovec, Z., Jovanović, N. (2002): Značaj suplementacije mikroelemenata u prevenciji metaboličkih poremećaja goveda. *Vet.glasnik*, 56(3-4) 153-175.
562. Sitar, D.S., Thornhill, D.P. (1972): Propylthiouracil: absorption, metabolism and excretion in the albino rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 183(2):440-8.

563. Skaar, T.C., Baumrucker, T.C., Deaver, D.R., Blum, J.W., (1994): Diet effects and ontogeny of alterations of circulating insulin-like growth factor binding proteins in newborn dairy calves. *J. Anim. Sci.*, 72, 421-7.
564. Skaar, T.C., Vega, J.R., Pyke, S.N., Baumrucker, C.R. (1991): Changes in insulin-like growth factor-binding proteins in bovine mammary secretions associated with pregnancy and parturition. *J Endocrinol.*,131(1):127-33.
565. Slebodziński, A.B., Lipczak, W., Brzezińska-Slebodzińska, E. (1995): Peroral administration of triiodothyronine (T3) affects absorption of immunolactoglobulins in calves. *Reprod. Nutr. Dev.*, 35(4):387-93.
566. Smerieri, A., Petraroli, M., Ziveri, M.A., Volta, C., Bernasconi, S., Street, M.E. (2011): Effects of cord serum insulin, IGF-II, IGFBP-2, IL-6 and cortisol concentrations on human birth weight and length: pilot study. *PLoS One.*, 6(12):e29562.
567. Smith, J.M., Van Amburgh, M.E., Díaz, M.C., Lucy, M.C., Bauman, D.E. (2002): Effect of nutrient intake on the development of the somatotropic axis and its responsiveness to GH in Holstein bull calves. *J Anim Sci.* 80(6):1528-37.
568. Smits, G., Campillo, M., Govaerts, C., Janssens, V., Richter, C., Vassart, G., Pardo, L., Costagliola, S. (2003): Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand binding. *EMBO J* 22(11):2692-703.
569. Smyth, J.A., Goodall, E.A., McCoy, M.A., Ellis, W.A. (1996): Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: a study of calves with an abnormal thyroid gland. *Vet Rec.*, 6;139(1):11-6.
570. Song, Y., Driessens, N., Costa, M., De Deken, X., Detours, V., Corvilain, B., Maenhaut, C., Miot, F., Van Sande, J., Many M.C., Dumont J. E. (2007): Review: Roles of Hydrogen Peroxide in Thyroid Physiology and Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(10):3764–3773.
571. Sparks, A.L., Kirkpatrick, J.G., Chamberlain, C.S., Waldner, D., Spicer, L.J. (2003): Insulin like growth factor-I and its binding proteins in colostrum compared to measures in serum of Holstein neonates. *J. Dairy Sci.*, 86, 2022-9.
572. Spaventi, R., Antica, M., Pavelić, K. (1990): Insulin and insulin-like growth factor I (IGF I) in early mouse embryogenesis. *Development*, 108(3):491-5.

573. Spitzweg, C., Joba, W., Morris, J.C., Heufelder, A.E. (1999): Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid*, 9(8):821-30.
574. Spitzweg, C., Morris, J.C. (2002): Sodium Iodide Symporter (NIS) and Thyroid, *Hormones*, 1(1):22-34.
575. St Germain, D.L., Galton, V.A. (1997): The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid.*, 7(4):655-68.
576. St.Germain, D.L. (1988): The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thiol-disulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5-deiodinase. *Endocrinology.*, 122:1860–1868.
577. Stanko, R.L., Guthrie, M.J., Randel, R.D. (1991): Response to environmental temperatures in Brahman calves during the first compared to the second day after birth. *J Anim Sci.*, 69(11):4419-27.
578. Steinhardt, M., Thielscher, H.H., von Horn, T., von Horn, R., Smidt, D. (1995): Thyroid hormones in cesarean-delivered suckling calves after birth and in the first days of life—maternofetal relations and early postnatal adaptation reactions. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 102 430-4.
579. Steinhoff-Wagner, J., Görs, S., Junghans, P., Bruckmaier, R.M., Kanitz, E., Metges, C.C., Hammon, H.M. (2011b): Maturation of endogenous glucose production in preterm and term calves *J Dairy Sci.*, 94(10):5111-23.
580. Steinhoff-Wagner, J., Görs, S., Junghans, P., Bruckmajer, R.M., Kanitz, E., Metges, C.C. (2011a): Intestinal glucose absorption but not endogenous glucose production differs between colostrum- and formula-fed neonatal calves. *J Nutr*, 141, 48-55.
581. Steinsapir, J., Bianco, A.C., Buettner, C., Harney, J., Larsen, P.R. (2000): Substrate-induced down-regulation of human type 2 deiodinase (hD2) is mediated through proteasomal degradation and requires interaction with the enzyme's active center. *Endocrinology*.141(3):1127-35.
582. Stewart, R.,E., Stevenson, J.,S., Minton, J.,E., (1994): Serum hormones during the estrous cycle and estrous behavior in heifers after administration of propylthiouracil and thyroxine. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 11:1-12.

583. Stilwell, G., Carvalho, R.C. (2011): Clinical outcome of calves with failure of passive transfer as diagnosed by a commercially available IgG quick test kit *Can Vet J.* 52(5): 524–526.
584. Stojić, V., Gvozdić, D., Šamanc, H., Jovanović, I., Frantrić, N. (2005): Thyroid gland hormones in newborn calves treated with clinoptiololite receiving different amounts of colostrum *Acta Veterinaria (Beograd)*, 55, (1): 3-10.
585. Stojić, V., Nikolić, J.A., Huszenicza, Gy., Šamanc, H., Gvozdić, D., Kirovski, D. (2002): Plasma levels of triiodothyronine, thyroxine and cortisol in newborn calves, *Acta Vet (Belgrade)*, 52, 85-96.
586. Stott, G.H. (1980): Immunoglobulin absorption in calf neonates with special considerations of stress. *J Dairy Sci.* 63(4):681-8.
587. Strbak, V., Tomsik, F. (1988): Thyroid hormone levels in cow maternal and fetal sera during last trimester of pregnancy. *Endocrinol Exp.*, 22:113–6.
588. Strum, J.M. (1979): Alterations within the rat thyroid gland during vitamin A deficiency *Am. J. Anat.*, 156(2):169-82.
589. Sugiyama, D., Kusuhara, H., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Nozaki, Y., Aburatani, H., Sugiyama, Y. (2003): Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J Biol. Chem.*, 278(44):43489-95
590. Sun, Y., Lu, X., Gershengorn, M.C. (2003): Thyrotropin-releasing hormone receptors—similarities and differences. *J. Mol. Endocrinol.*, 30, 87–97.
591. Suzuki, C., Nagasaki, H., Okajima Y., Suga, H., Ozaki, N., Arima, H., Iwasaki, Y., Oiso, Y. (2009): Inflammatory cytokines regulate glycoprotein subunit beta5 of thyrostimulin through nuclear factor-kappaB. *Endocrinology.*, 150(5):2237-43.
592. Suzuki, K., Mori, A., Saito, J., Moriyama, E., Ullianich, L., Kohn, L.D. (1999): Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake by suppressing expression of the sodium/iodide symporter gene. *Endocrinology.*, 140(11):5422-30.
593. Svendsen, L.S., Weström, B.R., Svendsen, J., Olsson, A.C., Karlsson, B.W. (1990): Intestinal macromolecular transmission in underprivileged and unaffected newborn pigs: implication for survival of underprivileged pigs. *Res. Vet. Sci.* 48, 184-189

594. Symonds, M.E., Andrews, D.C., Buss, D.S., Clarke, L., Lomax, M.A. (1996): Influence of rearing temperature on lung development following methimazole treatment of postnatal lambs. *Experimental Physiology*, 81, 673-683.
595. Szkudlinski, M.W., Fremont, V., Ronin, C., Weintraub, B.D. (2001): Thyroid-stimulating Hormone and Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Structure-Function Relationships. *Physiol. Rev.* 82: 473-502.
596. Szkudlinski, M.W., Teh, N.G., Grossmann, M., Tropea, J.E., Weintraub, B.D. (1996): Engineering human glycoprotein hormone superactive analogues. *Nat. Biotechnol.*, 14(10):1257-63.
597. Szkudlinski, M.W., Thotakura, N.R., Weintraub, B.D. (1995): Subunit-specific functions of N-linked oligosaccharides in human thyrotropin: role of terminal residues of alpha- and beta-subunit oligosaccharides in metabolic clearance and bioactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 26;92(20):9062-6.
598. Tabares, F.P., Jaramillo, J.V.B., Ruiz-Cortés, Z.T. (2014): Review Article Pharmacological Overview of Galactogogues. *Veterinary Medicine International*, 2014: ID 602894, 20 p.
599. Tagami, T., Park, Y., Jameson, J.L.(1999): Mechanisms that mediate negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by the thyroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.*, 6;274(32):22345-53.
600. Taguchi, Y., Tasaki, Y., Terakado, K., Kobayashi, K., Machida, T., Kobayashi, T. (2010): Impaired insulin secretion from the pancreatic islets of hypothyroidal growth-retarded mice. *J Endocrinol.*, 206(2):195-204.
601. Takahashi, K., Takahashi, E., Ducusin, R., Tanabe, S., Uzuka, Y., Sarashina, T., (2001): Changes in serum thyroid hormone levels in newborn calves as a diagnostic index of endemic goiter. *J.Vet. Med. Sci.* 63(2): 175-178.
602. Tanaka, K., Chazenbalk, G.D., McLachlan, S.M., Rapoport, B. (1999): Subunit structure of thyrotropin receptors expressed on the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 26;274(48):33979-84.
603. Tancin, V., Cupka, P. (1991): Concentration of thyroid-hormones in calves within the 1st 6 months, *Zivocisna vyroba*, 36, 755-62.

604. Taurog, A. (1996): Hormone synthesis: Thyroid iodine metabolism. U: The Thyroid, 7th Edition (Eds.L.E. Braverman, R.D. Utiger), Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 47-81.
605. Taurog, A. (2000): Hormone synthesis: thyroid hormone metabolism. In: Warner and Ingbar's The thyroid 8th (ed. Braverman, L.E., and Utiger, R.D.). Lippincot Williams&Wilkins, New York, 61-84.
606. Taverne, M.A.M., Bevers, M.M., van der Weyden, G.C., Dieleman, S.J., Fontijne, P. (1988): Concentration of growth hormone, prolactin, and cortisol in fetal and maternal blood and amniotic fluid during late pregnancy and parturition in cows with cannulated fetuses. *Anim. Reprod. Sci.*, 17: 51-59.
607. Taylor, A., Flower, R., Buckingham, J. (1995); Dexamethasone inhibits the release of TSH from the rat anterior pituitary gland in vitro by mechanisms dependent on de novo protein synthesis and lipocortin 1. *J. Endocrinol.*, 147: 533-544.
608. Taylor, T., Weintraub, B.D. (1985): Thyrotropin (TSH)-releasing hormone regulation of TSH subunit biosynthesis and glycosylation in normal and hypothyroid rat pituitaries. *Endocrinology*. 116(5):1968-76.
609. Thonberg, H., Fredriksson, J.M., Nedergaard, J., Cannon, B. (2002): A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochem.J.*, 364:73–7
610. Thrift, T.A., Bernal, A., Lewis, A.W., Neuendorff, D.A., Willard, C.C., Randel, R.D. (1999a): Effects of induced hypothyroidism on weight gains, lactation, and reproductive performance of primiparous Brahman cows. *J. Anim. Sci.*, 77:1844-1850.
611. Thrift, T.A., Bernal, A., Lewis, A.W., Neuendorff, D.A., Willard, C.C., Randel, R.D. (1999b): Effects of induced hypothyroidism or hyperthyroidism on growth and reproductive performance of Brahman heifers. *J. Anim. Sci.*, 77:1833-1843.
612. Toni, R., Lechan, R.M. (1993): Neuroendocrine regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the tuberoinfundibular system. *J. Endocrinol. Invest.*, 16:715–53.

613. Tóthová, C., Nagy, O., Kovač, G. (2014): Changes in the concentrations of serum protein fractions in calves with age and nutrition. *Italian Journal of Animal Science* volume 13:2993.
614. Toyoda, N., Kaptein, E., Berry, M.J., Harney, J.W., Larsen, P.R., Visser, T.J. (1997): Structure–activity relationships for thyroid hormone deiodination by mammalian type I iodothyronine deiodinases. *Endocrinology*, 138 (1): 213–219.
615. Toyoda, N., Zavacki, A.M., Maia, A.L., Harney, J.W., Larsen, P.R. (1995): A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Molecular and Cellular Biology*, 15(9):5100–5112.
616. Twyffels, L., Massart, C., Golstein, P.E., Raspe, E., Van Sande, J., Dumont, J.E., Beauwens, R., Kruys, V. (2011): Pendrin: the thyrocyte apical membrane iodide transporter? *Cell Physiol. Biochem.* 28(3):491-6.
617. Twyffels, L., Strickaert, A., Virreira, M., Massart, C., Van Sande, J., Wauquier, C., Beauwens, R., Dumont, J.E., Galiotta, L.J., Boom, A., Kruys, V. (2014): Anoctamin-1/TMEM16A is the major apical iodide channel of the thyrocyte. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 15;307(12):C1102-12.
618. Tyler, J.W., Hancock, D.D., Wiksie, S.E., Holler, S.L., Gay, J.M., Gay, C.C. (1998): Use of serum protein concentration to predict mortality in mixed-source dairy replacement heifers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12 (2) 79-83.
619. Umesono, K., Evans, R.M. (1989): Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone. *Cell.* 30;57(7):1139-46.
620. Urman, S., Critchlow, V. (1983): Long term elevations in plasma thyrotropin, but not growth hormone, concentrations associated with lesion-induced depletion of median eminence somatostatin. *Endocrinology*, 112(2):659-64.
621. Vale, W., Vaughan, J., Yamamoto, G., Spiess, J., Rivier, J. (1983): Effects of synthetic human pancreatic (tumor) GH releasing factor and somatostatin, triiodothyronine and dexamethasone on GH secretion in vitro. *Endocrinology.*, 112:1553–1555.
622. Van Den Akker, C.H.P., Brakee, F.W.J., Schierbeek, H., Rietveld T., Wattimena, D.J.L., Bunt, J.E.H., van Goudoever, J. B. (2007): Albumin synthesis in premature

- neonates is stimulated by parenterally administered amino acids during the first days of life. *J. Clin. Nutr.* 86: 1003-1008.
623. Van den Hove, M.F., Croizet-Berger, K., Tyteca, D., Selvais, C., de Diesbach, P., Courtoy, P.J. (2007): Thyrotropin activates guanosine 5'-diphosphate/guanosine 5'-triphosphate exchange on the rate-limiting endocytic catalyst, Rab5a, in human thyrocytes in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.*, 92(7):2803-10.
624. Van der Deure W.M., Peeters, R.P., Visser, T.,J. (2010): Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *Journal of Molecular Endocrinology* 44, 1–11
625. Van der Deure, W.M., Hansen, P.S., Peeters, R.P., Kyvik, K.O., Friesema, E.C., Hegedüs, L., Visser, T.J. (2008): Thyroid hormone transport and metabolism by organic anion transporter 1C1 and consequences of genetic variation. *Endocrinology.*, 149(10):5307-14.
626. Van Haasteren, G.A.C., van der Meer, M.J.M., Hermus, A.R.M.M., Linkels, E., Klootwijk, W., Kaptein, E., (1994): Different effects of the continuous infusion of interleukin-1 and interleukin-6 on the hypothalamic– hypophysial–thyroid axis. *Endocrinology.*, 135 1336–1345.
627. Van Heuverswyn, B., Streydio, C., Brocas, H., Refetoff, S., Dumont, J., Vassart, G. (1984): Thyrotropin controls transcription of the thyroglobulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81(19):5941-5.
628. Van Sande, J., Massart, C., Beauwens, R., Schoutens, A., Costagliola, S., Dumont, J.E., Wolff, J. (2003): Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology.*, 144(1):247-52.
629. Van Vugt, H.H., Van de Heijning, B.J., Van der Beek, E.M. (2008): Somatostatin in the rat periventricular nucleus: sex differences and effect of gonadal steroids *Exp Brain Res* 188(4)483–491.
630. Vanden Bussche, J., Kiebooms, J.A., De Clercq, N., Deceuninck, Y., Le Bizec, B., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L. (2011): Feed or food responsible for the presence of low-level thiouracil in urine of livestock and humans? *J. Agric Food Chem.*, 25;59(10):5786-92.

631. Varewijck, A.J., Janssen, J.A. (2012): Insulin and its analogues and their affinities for the IGF1 receptor. *Endocr. Relat. Cancer.*, 5;19(5):F63-75.
632. Vegad, J.L. (2010): *A Textbook of Veterinary Systemic Pathology Global Media Publications*, 245-246.
633. Veissier, I., van Reenen, C.G., Andanson, S., Leushuis, I.E.(1999): Adrenocorticotrophic hormone and cortisol in calves after corticotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.*, 77(8):2047-53.
634. Vermorel, M., Dardillat, C., Vernet, J., Saido Demigne, C. (1983): Energy metabolism and thermoregulation in the newborn calf. *Ann. Rech. Vet.*, 14(4):382-9.
635. Vicente, L.L., de Moura, E.G., Lisboa, P.C., Monte Alto Costa, A., Amadeu, T., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Passos, M.C. (2004): Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring. *Nutrition.*, 20(10):924-8.
636. Villar, D., Rhind, S.,M., Arthur, J.,R., Goddard, P.,J., (2002): Manipulation of thyroid hormones in ruminants – a tool to understand their physiological role and identify their potential for increasing production efficiency. *Aust. J. Agric. Res.*, 53,259-270.
637. Villarroel, A., Miller, B.T., Johnson, D.E., Noyels, R., K, Ward, J. K. (2013): Factors Affecting Serum Total Protein and Immunoglobulin G Concentration in Replacement Dairy Calves *Adv Dairy Res Vol 1, Iss 2, 1000106*
638. Virion, A., Pommier, J., Deme, D., Nunez, J. (1981): Kinetics of thyroglobulin iodination and thyroid hormone synthesis catalyzed by peroxidases: the role of H₂O₂. *Eur J Biochem.*;117(1):103-9.
639. Wagner, M.S., Wajner, S.M., Dora, J.M., Maia, A.L. (2007): Regulation of Dio2 gene expression by thyroid hormones in normal and type 1 deiodinase-deficient C3H mice. *J. Endocrinol.*, 193(3):435-44.
640. Wang, D., Xia, X., Liu, Y., Oetting, A., Walker, R.L., Zhu, Y., Meltzer, P., Cole, P.A., Shi, Y.B., Yen, P.M. (2009): Negative Regulation of TSH α Target Gene by Thyroid Hormone Involves Histone acetylation and Corepressor Complex Dissociation. *Mol. Endocrinol.*, 23(5): 600–609.

641. Wang, J., Whetsell, M., Klein, J.R. (1997): Local hormone networks and intestinal T cell homeostasis. *Science*. 28;275(5308):1937-9.
642. Watson, A.J., Watson, P.H., Arcellana-Panlilio, M., Warnes, D., Walker, S.K., Schultz, G.A., Armstrong, D.T., Seamark, R.F. (1994): A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. *Biol. Reprod.*, 50(4):725-33.
643. Weintraub, B.D., Gesundheit, N., Taylor, T., Gyves, P.W. (1989) Effect of TRH on TSH glycosylation and biological action. *Ann. NY Acad. Sci.* 553:205–213.
644. Weintraub, B.D., Stannard, B.S., Linnekin, D., Marshall, M. (1980): Relationship of glycosylation to de novo thyroid-stimulating hormone biosynthesis and secretion by mouse pituitary tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 255(12):5715-23.
645. Weiss, S.J., Philp, N.J., Ambesi-Impiombato, F.S., Grollman, E.F. (1984): Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3,5-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology*, 114:1099–1107.
646. Whitaker, S.M., Jeffrey, S.L., Willett, L.B., Borger, D.C., Neiswander, R.L., Schanbacher, F.L., Weiss, W.P. (1996): The effect of cortisol and time of first feeding on immunoglobulin absorption in Holstein calves. *Anim. Sci. Res. Rev.*, 156: 87-92.
647. Whittaker, D.A. (1999): Trace elements – the real role in dairy cow fertility? *Cattle Practice*, 7, 239-41.
648. Wildberger, E., Von Gruenigen, C., Kohler, J., Kohler, H., Studer, H. (1983): Regulation of enzymatic iodothyronine synthesis in thyroglobulin by low concentrations of iodide. *Eur. J. Biochem.*, 15;130(3):485-90.
649. Williams, G.R., (2000): Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol, Cell Biol.*, 20(22):8329-42.
650. Williams, G.R., Bassett, J.H. (2011): Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase. *J Endocrinol.* 2011 Jun;209(3):261-72.
651. Wilson, J.T., Brown, R.D., Cherek, D.R., Dailey, J.W., Hilman, B., Jobe, P.C., Manno, B.R., Manno, J.E., Redetzki, H.M., Stewart, J.J. (1980): Drug excretion in human breast milk: principles, pharmacokinetics and projected consequences. *Clin Pharmacokinet*, 5:1–66.

652. Wittmann, G., Liposits, Z., Lechan, R.M., Fekete, C. (2002): Medullary adrenergic neurons contribute to the neuropeptide Y-ergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat. *Neurosci. Lett.*, 324:69–73.
653. Wittmann, G., Liposits, Z., Lechan, R.M., Fekete, C. (2004): Medullary adrenergic neurons contribute to the cocaine and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*, 1006:1–7.
654. Woelfle, J., Billiard, J., Rotwein, P., (2003): Acute control of insulin-like growth factor-I gene transcription by growth hormone through Stat5b. *J. Biol. Chem.*, 20;278(25):22696-702.
655. Wolff, J. (1998): Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacol Rev.*, 50(1):89-105.
656. Wondisford, F.E., Radovick, S., Moates, J.M., Usala, S.J., Weintraub, B.D. (1988): Isolation and characterization of the human thyrotropin beta-subunit gene. Differences in gene structure and promoter function from murine species. *J. Biol. Chem.*, 5;263(25):12538-42.
657. Wrutniak, C., Cabello, G. (1987): Effects of food restriction on cortisol, TSH and iodothyronine concentrations in the plasma of the newborn lamb. *Reprod. Nutr. Dev.*, 27(3):721-32.
658. Wrutniak, C., Cabello, G.J. (1986): Influence of hypothyroidism on the lipolytic activity of norepinephrine in the newborn lamb. *Endocrinol.*, 108(3):451-4.
659. Wu, S.Y., Green, W.L., Huang, W.S., Hays, M.T., Chopra, I.J. (2005): Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid.*;15(8):943-58.
660. Wu, S.Y., Polk, D.H., Huang, W.S., Green, W.L., Thai, B., Fisher, D.A. (2006): Fetal-to-maternal transfer of thyroid hormone metabolites in late gestation in sheep. *Pediatr Res.* 59(1):102-6.
661. Xu, N., Jiang, X. (2012): Molecular Characterization of Hypothalamo– Pituitary– Thyroid Genes in Pig (*Sus Scrofa*). *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*, Dr. Carlos C. Perez-Marin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0031-7, InTech, DOI: 10.5772/37549.

662. Yamada, P.M., Lee, K.W. (2009): Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *Am.J.Physiol, cell Physiol*, 296(5):C954-76
663. Yamazaki, K., Sato, K., Shizume, K., Kanaji, Y., Ito, Y., Obara, T., Nakagawa, T., Koizumi, T., Nishimura, R. (1995): Potent thyrotropic activity of human chorionic gonadotropin variants in terms of ¹²⁵I incorporation and de novo synthesized thyroid hormone release in human thyroid follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80(2):473-9.
664. Yanga, X., McGraw, R.A., Su, X., Katakam, P., Grosse, W.M., Li, O.W., Ferguson, D.C. (2000): Canine thyrotropin beta-subunit gene: cloning and expression in *Escherichia coli*, generation of monoclonal antibodies, and transient expression in the Chinese hamster ovary cells. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 18(4):363-78.
665. Yen, P.M. (2001): Physiological and molecular basis of thyroid hormone action *Physiol Rev.*;81(3):1097-142.
666. Yeung, C.M., Chan,C.B., Leung, P.S., Cheng, C.H. (2006): Cells of the anterior pituitary. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38(9):1441-9.
667. Yoshida, A., Taniguchi, S., Hisatome, I. (2002): Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87(7):3356-3361.
668. Yoshihara, A., Hara, T., Kawashima, A., Akama, T., Tanigawa, K., Wu, H., Sue, M., Ishido, Y., Hiroi, N., Ishii, N., Yoshino, G., Suzuki, K. (2012): Regulation of dual oxidase expression and H₂O₂ production by thyroglobulin. *Thyroid*, 22(10):1054-62.
669. Yu, R., Ashworth, R., Hinkle, P.M. (1998): Receptors for thyrotropin-releasing hormone on rat lactotropes and thyrotropes. *Thyroid*, 8:887–894
670. Zadorski, P., Nicol, F., McCoy, M.A., Smith, J.A., Kennedy, D.G., Beckett, G.J., Arthur, J.R. (1998): Iodine deficiency in cattle: compensatory changes in thyroidal enzymes. *Res. Vet. Sci.*, 64, 209-211.
671. Zeöld, A., Pormüller, L., Dentice, M., Harney, J.W., Curcio-Morelli, C., Tente, S.M., Bianco, A.C., Gereben, B. (2006): Metabolic instability of type 2 deiodinase is transferable to stable proteins independently of subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 281:31538–31543.

672. Zhang, C.Y., Kim, S., Harney, J.W., Larsen, P.R. (1998): Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology*. 139: 1156–1163.
673. Zhang, X.K., Kahl, M. (1993): Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol Metab.*, 4(5):156-62.
674. Zhang, X.K., Wills, K.N., Graupner, G., Tzukerman, M., Hermann, T., Pfahl, M. (1991): Ligand-binding domain of thyroid hormone receptors modulates DNA binding and determines their bifunctional roles. *New Biol.*, 3(2):169-81.
675. Zimmermann, M.B. (2006): The influence of iron status on iodine utilization and thyroid function. *Annu Rev Nutr.*, 26:367-89.
676. Zimmermann, M.B. (2007): Interactions of vitamin A and iodine deficiencies: effects on the pituitary-thyroid axis. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 77(3):236-40.
677. Zoeller, R.T.S., Tan, W., Tyl, R. (2007): General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in *Critical Reviews in Toxicology*, 37: 1-2, 11–53, 2007.

BIOGRAFIJA

Petar Dodovski, dr veterinarske medicine, rođen je 12. jula 1974. godine u Bitolj, R. Makedonija. Osnovnu i srednju veterinarsku školu, smjer veterinarski tehničar, završio je u Bitolj. Na Fakultet veterinarske medicine u Skopjlu Univerzitet „Sv Kiril i Metdij“ upisao se školske 1993/1994 godine, a diplomirao 2000. godine, sa prosječnom ocjenom 8,73.

Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2010/2011 godine i položio sve ispite predviđene planom i programom studija.

Nakon završenih osnovnih studija, 2002. i 2009. godine radio je u veeleđrogerija i apoteka „Paster DOOOEL“ . Od 16. oktobar 2009. godine zaposlen je kao asistent Fakultet Veterinarske medicine u Bitolj Univerzitet „Sv Kliment Ohridski“ Bitolj za uža naučna oblast Fiziologija životinja. Učesnik je domaćih i regionalnih naučnih i stručnih skupova iz oblasti veterinarske medicine. Stručni ispit za doktora veterinarske medicine položio je 2005. godine i član je Veterinarske komore R Makedonije. Živi i radi u Bitolj.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани:

број уписа: _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Хормонални и метаболички статус телади неонаталног периода пореклом од примапарних мајки третираних са пропилтиоурацилом током гравидитета.

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

Потпис докторанда

У Београду,

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора:

Број уписа: _____

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: Хормонални и метаболички статус телади неонаталног периода пореклом од примапарних мајки третираних са пропилтиоурацилом током гравидитета.

Ментор: Проф. др Данијела Кировски

Потписани:

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду,

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Хормонални и метаболички статус телади неонаталног периода пореклом од примапарних мајки третираних са пропилтиоурацилом током гравидитета

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

У Београду,

Потпис докторанда
