

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jasmina B. Živanović

STRUKTURNE I FUNKCIONALNE
PROMENE PARAŠTITASTIH ŽLEZDA I
BUBREGA NAKON PRIMENE STEROIDA,
IZOFLAVONA I KALCIJUMA U
ANIMALNOM MODELU ANDROPAUZE

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jasmina B. Živanović

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
CHANGES OF PARATHYROID GLANDS
AND KIDNEYS AFTER TREATMENT
WITH STEROIDS, ISOFLAVONES AND
CALCIUM IN AN ANIMAL MODEL OF THE
ANDROPAUSE

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI

dr Branko Filipović, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,
Univerzitet u Beogradu

dr Maja Čakić Milošević, docent
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Branko Filipović, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,
Univerzitet u Beogradu

dr Maja Čakić Milošević, docent
Biološki fakultet,
Univerzitet u Beogradu

dr Verica Milošević, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,
Univerzitet u Beogradu

dr Branka Šošić-Jurjević, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,
Univerzitet u Beogradu

dr Vladimir Ajdžanović, naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,
Univerzitet u Beogradu

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

Želim da se zahvalim:

Dr Branku Filipoviću, mom Mentoru, na ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći, korisnim savetima, uvek inovativnom pristupu, prijateljskom stavu i krilima slobode koje mi je pružio tokom svih godina našeg zajedničkog rada. Njegova predanost, profesionalnost i podrška u izradi ove teze su bili od neprocenjivog značaja.

Dr Maji Čakić Milošević, na srdačnosti, konstruktivnim i dragocnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove teze.

Dr Verici Milošević, plemenitom, požrtvovanom i predanom čoveku i rukovodiocu, na poverenju i rečima ohrabrenja, kao i na plodnim naučnim diskusijama i savetima koji su bili od velikog značaja za izradu ove teze. Privilegija je biti deo naučno-istraživačkog tima kojim ona rukovodi.

Dr Branki Šošić-Jurjević, na pozitivnoj energiji koju je unosila u naše brojne naučne diskusije, sugestijama, komentarima i značajnom intelektualnom doprinosu kvalitetu ove teze.

Dr Vladimiru Ajdžanović, na bodrenju i ne dopuštanju da potonem, na strpljenju, na večitom preispitivanju, na dugim razgovorima, na insistiranju da uvek težim ka boljem, i kao naučnik i kao čovek, a najviše na tome što mi je bio iskren prijatelj svih ovih godina.

Dr Milki Sekulić, na pruženoj šansi i poverenju koje mi je ukazala, prenešenom znanju, a posebno na uvođenju u čudesan svet elektronske mikroskopije, koji je blistavom nijansom obojio moj naučni put.

Veliku zahvalnost dugujem Laboratoriji „INTER-LIGHT” i pokojnoj dr Dani Brüner na predusretljivosti i velikoj stručnoj pomoći u pogledu biohemijskih analiza, kao i Rajku Petroviću iz Instituta za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić”, Medicinskog fakulteta, bez čijeg angažovanja elektronske mikrografije ne bi bile na ovako visokom estetskom nivou.

Ivani Medigović, neizmerno hvala na pomoći u eksperimentalnom radu, na zajedničkom savladavanju velikih i malih prepreka, na strpljenju i nestrpljenju, na veri (i zahtevanju) da uvek mogu više i bolje, a najviše na prijateljstvu.

Zahvalnost na podršci, pomoći, i na dobroj energiji dugujem dragim kolegicama Milici, Nataši, Lani i Natašici u prevladavanju svih teškoća u eksperimentalnom radu. Mom dragom kolegi i prijatelju Marku dugujem veliku zahvalnost za podršku i pomoć koju mi je nesebično pružao u izradi ove doktorske teze. Hvala Mariji i Ani na vedrom duhu i pesmi, jer prijateljstvo se ne bira ono biva, najčešće subotom na hodniku.

Hvala mojim dragim prijateljima sa kojima sam delila lepe, a i one manje lepe trenutke. Posebnu zahvalnost dugujem Mileni, Ani, Saletu, i mom kumu Vladi na poletnoj energiji, strpljenju i veri u mene.

Hvala mojim najdražim Pantelićima i Živanovićima na razumevanju, ljubavi i podršci u svakom trenutku.

*Najveću zahvalnost dugujem mom suprugu Nenadu čija ljubav,
podrška i razumevanje svemu daju smisao...*

Strukturne i funkcionalne promene paraštitastih žlezda i bubrega nakon primene steroida, izoflavona i kalcijuma u animalnom modelu andropauze

REZIME

Postepeno smanjenje koncentracije testosterona u cirkulaciji tokom procesa starenja, koje je u čvrstoj vezi sa povećanom učestalošću nastanka kardiovaskularnih oboljenja, benignih i malignih oboljenja prostate i osteoporoze, označava se kao andropauza. Terapije steroidnim hormonima, kao i konvencionalna terapija Vit D i kalcijumom, koje se primenjuju u prevenciji i tretmanu menopauzalnih i andropauzalnih simptoma kod oba pola, ispoljavaju i neželjena dejstava i povećavaju rizik od nastanka kardiovaskularnih oboljenja, hiperfosfaturije, hipertrofije prostate benignog karaktera, kancera dojke i prostate. Zbog brojnih negativnih efekata primenjivanih terapija, u poslednje vreme sve je veći broj istraživanja koja teže pronalaženju rešenja sa ciljem prevazilaženja navedenih problema. Veliku pažnju privlače izoflavoni soje, genistein i daidzein, koji su predmet istraživanja brojnih studija, prvenstveno zbog svog blagotvornog efekta na simptome starenja kod oba pola.

Cilj ovog istraživanja bio je rasvetljavanje dejstava steroida, izoflavona i kalcijuma na ključne regulatore homeostaze Ca^{2+} i Pi u animalnom modelu andropauze, i utvrđivanje njihovog potencijalnog efekta u očuvanju metabolizma minerala koji je narušen tokom procesa starenja.

Mušjaci pacova Wistar soja, starosti 15 meseci, su orhidektomisani (Orx) i lažno operisani (SO) u ketaminskoj anesteziji (15 mg/kg b.w.). Dve nedelje nakon operacije Orx životinje su podeljene u eksperimentalne grupe (n=8), kojima su subkutano aplikovani testosteron-propionat (5mg/kg t.m.; TP), estradiol-dipropionat (0.625 mg/kg t.m.; EDP), vitamin D (50 µg/kg t.m.; Vit D), genistein (30 mg/kg t.m.; G), daidzein (30 mg/kg t.m.; D) i intramuskularno kalcijum (28.55 mg/kg t.m.; Ca), svakog dana tokom 3 nedelje. Svaka tretirana grupa je imala svoje kontrolne SO i Orx grupe za poređenje, kojima je aplikovan odgovarajući volumen adekvatnog rastvarača. Tokom izvođenja eksperimenta, životinjama su bile slobodno dostupne voda i laboratorijska hrana, koja nije sadržala sastojke soje ni leguminoza, sa kazeinom kao izvorom proteina. Životinje su dekapitovane 24h nakon poslednjeg tretmana, paraštitaste žlezde i levi bubrezi su

izolovani, izmereni i pripremljeni za tehnike svetlosne i elektronske mikroskopije, dok su desni bubrezi zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80°C do korišćenja i izolacije RNK. Analiza tkiva je izvršena korišćenjem svetlosne mikroskopije, tehnike imunohistohemijskog bojenja i metoda stereološke analize, te transmisiona elektronske mikroskopije, a ekspresija gena je određena reakcijom lančanog umnožavanja u realnom vremenu. Biohemijskim metodama određene su koncentracije PTH, Ca^{2+} , Pi i kreatinina u serumu, kao i koncentracije Ca^{2+} , Pi i kreatinina u urinu. Dobijeni podaci su statistički obrađeni.

Volumen paraštitastih žlezda značajno je povećan kod Orx pacova u odnosu na SO grupu. Kod Orx životinja tretiranih TP-om, EDP-om ili Vit D volumen paraštitastih žlezda je značajno smanjen u poređenju sa Orx pacovima. Volumenska gustina glavnih ćelija je značajno smanjena, dok je volumenska gustina intersticijuma značajno povećana nakon tretmana EDP-om u odnosu na Orx grupu životinja. Tretman genisteinom je uzrokovao značajno povećanje volumena paraštitastih žlezda, dok je tretman daidzeinom značajno smanjio volumen paraštitastih žlezda, u poređenju sa istom vrednošću kod Orx pacova. Tretmani genisteinom ili daidzeinom su statistički značajno smanjili volumensku gustinu glavnih ćelija, u poređenju sa Orx grupom životinja. Nakon tretmana genisteinom i daidzeinom, volumenska gustina intersticijuma je značajno povećana u odnosu na Orx grupu životinja. Kod životinja tretiranih kalcijumom, volumen paraštitastih žlezda je značajno smanjen, dok je volumenska gustina intersticijuma značajno povećana, u poređenju sa Orx pacovima. Kod Orx životinja nivo PTH u serumu je značajno povećan u odnosu na SO grupu, dok je nivo PTH nakon tretmana TP-om, EDP-om, Vit D, izoflavonima ili kalcijumom značajno smanjen u poređenju sa Orx životinjama. Intezitet NaPi 2a signala je redukovan kod Orx životinja, u odnosu na SO grupu. Tretmani TP-om, Vit D, genisteinom ili daidzeinom su značajno povećali nivo ekspresije iRNK za NaPi 2a i jačinu imunofluorescentnog signala za NaPi 2a na apikalnoj membrani ćelija proksimalnih tubula, u poređenju sa Orx grupom. Tretman EDP-om je značajno smanjio nivo iRNK za NaPi 2a, kao i prisustvo kotransportera na apikalnoj membrani ćelija proksimalnih tubula, u odnosu na Orx pacove. Jačina imunofluorescentnog signala za PTH1R je povećana nakon Orx, u poređenju sa SO grupom. Nakon tretmana EDP-om signal za PTH1R je neznato promenjen u odnosu na Orx životinje, dok su tretmani TP-om, Vit D,

genisteinom, daidzeinom ili kalcijumom značajno smanjili jačinu imunofluorescentnog signala za PTH1R, u odnosu na Orx životinje. Ekspresija FGFR i Klotho receptora nije značajno promjenjena kod Orx grupe u poređenju sa SO pacovima. Tretman EDP-om je značajno povećao nivo ekspresije FGFR i Klotho receptora u odnosu na Orx kontrolnu grupu. Tretmani genisteinom ili daidzeinom su značajno smanjili ekspresiju FGFR, dok je ekspresija Klotho receptora povećana nakon genisteina, odnosno smanjena nakon daidzeinskog tretmana, u poređenju sa Orx životinjama. Koncentracije Ca^{2+} i Pi u serumu su značajno smanjenjene nakon Orx, dok su koncentracije Ca^{2+} i Pi u urinu povećane, u poređenju sa SO kontrolnom grupom životinja. Nakon tretmana TP-om, EDP-om, Vit D, genisteinom, daidzeinom ili kalcijumom koncentracije Ca^{2+} u serumu su povećane u odnosu na isti parametar kod Orx pacova. Koncentracija Pi u serumu je povećana nakon tretmana TP-om, genisteinom, daidzeinom i kalcijumom, u poređenju sa Orx kontrolom. Aplikovanje TP, EDP, Vit D, genisteina, daidzeina ili kalcijuma je uzrokovalo snižavanje koncentracije Ca^{2+} u urinu, u odnosu na Orx životinje. Tretmani Vit D, genisteinom, daidzeinom ili kalcijumom su snizili koncentraciju Pi u urinu, dok je tretman EDP-om povećao koncentraciju Pi u urinu, u poređenju sa Orx grupom.

Dobijeni rezultati pokazuju da tretmani andropauzalnih mužjaka pacova steroidima, izoflavonima i kalcijumom ispoljavaju izvesne razlike u jačini istosmernih efekata na ključne regulatore homeostaze Ca^{2+} i Pi, kod orhidektomisanih mužjaka pacova srednjeg životnog doba. Naime, tretmani izoflavonima ispoljavaju jači stimulatoran efekat na ekspresiju NaPi 2a kotransportera, intenzivnije snižavaju stepen zastupljenosti PTH1R, prisustvo i ekspresija FGFR u tubulima bubrega su izraženije redukovani, a promene u smanjenju koncentracija Ca^{2+} i Pi u urinu, odnosno povećanju koncentracija Ca^{2+} i Pi u serumu su više izražene, u poređenju sa blažim efektima tretmana steroidnim hormonima i kalcijumom. Navedene promene mogu ponovno uspostaviti homeostazu narušenu procesom starenja.

Ključne reči: andropauza, steroidi, izoflavoni, kalcijum, paraštitastežlezde, NaPi 2a, PTH1R, FGFR, Klotho receptor.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Endokrinologija

UDK broj: 577.6+547.926+612.126]:[612.447+612.46]:591.139 (043.3)

Structural and functional changes of parathyroid glands and kidneys after treatment with steroids, isoflavones and calcium in an animal model of the andropause

ABSTRACT

Andropause is defined as a gradual decline of serum testosterone concentration during ageing, which is related to an increased incidence of cardiovascular diseases, benign and malignant prostate diseases and osteoporosis. Using steroid hormones, as well as vitamin D and calcium in the treatment of osteoporosis and other ageing symptoms, in both genders, have some undesirable side effects, such as increased risk of cardiovascular diseases, hyperphosphaturia and prostate cancer. Taking into account the potentially harmful aspects of the hormone replacement therapy, an increasing emphasis is placed on the alternative, plant-originated therapeutics for osteoporosis. Accumulating evidence suggests that soy isoflavones may represent a promising alternative remedy for aging symptoms in both genders.

This study aimed to examine the effects of steroids, isoflavones and calcium on the structural and functional changes in parathyroid glands and specific functional proteins in the kidney tubules, responsible for Ca and Pi regulation, in an animal model of the andropause, and to determine their potential impact in the preservation of mineral metabolism impaired with ageing.

Fifteenth-month-old Wistar rats were orchidectomised (Orx) or sham (SO) operated under ketamine anesthesia. After 2 weeks of recovery, Orx animals were divided into experimental groups and treated subcutaneously with testosterone-propionate (5 mg/kg b.w.; TP), estradiol-dipropionate (0.625 mg/kg b.w.; EDP), vitamin D (50 µg/kg b.w.; Vit D), genistein (30 mg/kg b.w.; G), daidzein (30 mg/kg b.w.; D) or calcium intramuscularly (28.55 mg/kg b.w.; Ca) every day, for 3 weeks. Every treated group had a corresponding SO and Orx control groups treated with the proper amount of vehicle, following the same regime. Animals were fed a soy-free diet with corn oil as the fat source. The rats were decapitated 24h after the last injection, parathyroid glands and left kidneys were excised, their weight was measured and they were processed for light and electron microscopic examinations. Techniques of histochemical staining and immunohistochemical labeling, transmission electron microscopy, and stereological

analyses were performed. Gene expression levels were determined with Real-time PCR. Concentrations of PTH, Ca^{2+} , Pi and creatinin levels in serum and concentrations of Ca^{2+} , Pi and creatinin in urine were determined biochemically. The obtained data were statistically processed.

The volume of parathyroid glands in Orx rats was increased compared to the SO group. After treatments with TP, EDP or Vit D the parathyroid glands volumes were decreased, when compared to Orx animals. The volume density of chief cells after treatment with EDP was decreased, while the volume density of interstitium was increased, comparing to Orx rats. Treatment with genistein led to an increase of parathyroid gland volume, while treatment with daidzein decreased the same parameter, with regards to Orx group. The volume densities of chief cells were decreased after treatments with genistein or daidzein, while the volume densities of interstitium were increased, in comparison with Orx animals. Administration of calcium to Orx rats provoked the reduction of parathyroid glands volume, while the volume density of interstitium after same treatment was increased, comparing to the Orx rats. The lack of steroid hormones, provoked by Orx, led to the increment of serum PTH, when compared to the SO control group, while treatments with TP, EDP, Vit D, genistein, daidzein or calcium decreased the mentioned parameter, comparing to the Orx group. NaPi 2a expression in Orx animals was reduced in regards to its abundance in SO animals, although it was increased in TP, Vit D, genistein or daidzein groups, compared to the Orx rats. The treatment with EDP attenuated NaPi 2a expression, in comparison with Orx group. In Orx rats, the staining for PTH1R was stronger when compared to SO group, while the treatments with TP, Vit D, genistein, daidzein or calcium induced reduction of the PTH1R immunofluorescence, compared to Orx animals. The intensity of the PTH1R signal after EDP treatment was slightly reduced in regards to its abundance in Orx group. FGFR and Klotho receptor expression weren't significantly changed in Orx animals, when compared to the SO controls. After treatment with EDP, the expression of FGFR and Klotho receptors was increased, when compared to the Orx rats. Administration of genistein or daidzein caused the decrease in FGFR expression level, compared to Orx animals. Genistein treatment of Orx rats induced enhancement of Klotho receptor expression level, while daidzein treatment decrease it, in comparison with Orx rats. In Orx animals, Ca^{2+} and Pi serum concentrations were decreased, while

urine Ca^{2+} and Pi content was increased, in comparison with the SO control. After treatments with TP, EDP, Vit D, genistein, daidzein or calcium serum Ca^{2+} concentrations were increased, when compared to Orx animals. Treatments with TP, genistein, daidzein or calcium induced the increment of Pi serum concentrations, with regards to Orx rats. Application of TP, EDP, Vit D, genistein, daidzein or calcium to Orx rats led to decrease Ca^{2+} urine concentrations, comparing to Orx animals. Urine Pi concentrations after treatment with Vit D, genistein, daidzein or calcium were decreased, while EDP treatment induced enhancement of Pi urine concentration, with regards to Orx rats.

Our results showed that the treatments with steroids, isoflavones and calcium of andropausal male rats demonstrate some differences in the level of the same direction effects, demarcating widespread, commonly used therapies and alternative approaches in the regulation of Ca^{2+} and Pi homeostasis. Application of isoflavones led to the stronger increment in abundance and the expression level of NaPi 2a cotransporter, intensively decreased the presence of PTH1R, abundance and expression of FGFR in the kidney tubules was noticeably reduced, and decreased the concentrations of Ca^{2+} and Pi in urine, as well as more pronouncedly increased the concentrations of Ca^{2+} and Pi in the serum, when compared to the milder effects of treatments with steroids and calcium. The listed changes may reestablish mineral homeostasis, disturbed by the aging process.

Keywords: andropause, steroids, isoflavones, calcium, parathyroid gland, NaPi 2a, PTH1R, FGFR, Klotho receptor.

Research area: Biology

Area of special interest: Endocrinology

UDC number: 577.6+547.926+612.126]:[612.447+612.46]:591.139 (043.3)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Andropauza.....	1
1.2. Steroidni hormoni - mehanizmi delovanja.....	3
1.3. Izoflavoni - mehanizmi delovanja	7
1.4. Paraštitaste žlezde	12
1.4.1. Regulacija funkcije paraštitastih žlezda	15
1.5. Bubrezi.....	18
1.5.1. Reapsorpcija Pi u bubregu.....	21
1.5.2. Reapsorpcija Ca ²⁺ u bubregu.....	26
2. Ciljevi istraživanja	29
3. Materijal i metode	31
3.1. Eksperimentalne životinje.....	31
3.2. Eksperimentalne grupe.....	32
3.3. Histološko bojenje paraštitastih žlezda.....	33
3.4. Stereološka merenja paraštitastih žlezda	33
3.4.1. Volumen paraštitastih žlezda	34
3.4.2. Volumenska gustina glavnih ćelija i intersticijuma paraštitastih žlezda.....	35
3.5. Elektronska mikroskopija	35
3.6. Imunohistohemijsko bojenje specifičnih antigena.....	36
3.6.1. Imunofluorescentno obeležavanje NaPi 2a i PTH1R u tubulima bubrega....	36
3.6.2. Imunohistohemijsko obeležavanje FGFR i Klotho receptora u tubulima bubrega	37
3.7. Analiza ekspresije gena	38
3.7.1. Priprema uzoraka bubrega za izolaciju totalne RNK.....	38
3.7.2. Reakcija reverzne transkripcije	38

3.7.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu	39
3.8. Biohemijske analize	40
3.8.1. Određivanje koncentracije paratiroidnog hormona (PTH).....	41
3.8.2. Određivanje koncentracije kalcijuma (Ca^{2+}) u serumu i urinu	41
3.8.3. Određivanje koncentracije fosfata (Pi) u serumu i urinu	42
3.8.4. Određivanje koncentracije kreatinina u serumu i urinu	42
3.9. Statistička analiza podataka	42
4. Rezultati	43
4.1. Histološke i stereološke karakteristike paraštitastih žlezda kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom ...	43
4.1.1. Paraštitaste žlezde lažno operisanih i orhidektomisanih pacova.....	43
4.1.2. Paraštitaste žlezde orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidnim hormonima, izoflavonima i kalcijumom	47
4.2. Imunohistohemijske karakteristike i analiza relativne ekspresije gena specifičnih funkcionalnih proteina u bubrezima kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom	54
4.2.1. Imunofluorescentne karakteristike i analiza relativne ekspresije gena za NaPi 2a kotransporter u bubrezima kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom.....	54
4.2.2. Imunofluorescentne karakteristike PTH1 receptora u proksimalnim tubulima bubrega kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom.....	59
4.2.3. Imunohistohemijske karakteristike i analiza relativne ekspresije FGFR gena u distalnim tubulima bubrega kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom.....	62
4.2.4. Imunohistohemijske karakteristike i analiza relativne ekspresije gena za Klotho receptor u tubulima bubrega kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom.....	67
4.3. Biohemijski parametri u serumu i urinu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom	72

4.3.1. Koncentracija parathormona u serumu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom.....	72
4.3.2. Koncentracija kalcijuma u serumu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom.....	73
4.3.3. Koncentracija fosfora u serumu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom.....	76
4.3.4. Koncentracija kalcijuma u urinu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom.....	78
4.3.5. Koncentracija fosfora u urinu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom.....	80
4.3.6. Koncentracija kreatinina u serumu i urinu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom.....	82
5. Diskusija	84
6. Zaključci	95
7. Reference	98

1. Uvod

1.1. Andropauza

Andropauza, kao kulminirajuća faza starenja kod muškog pola, u čvrstoj je vezi sa smanjenjem koncentracije testosterona u cirkulaciji, koju prati povećana učestalost nastanka kardiovaskularnih oboljenja, benignih i malignih oboljenja prostate i osteoporoze (Vance, 2003). Precizno definisanje pojma andropauze odredilo bi je kao sindrom okarakterisan mnoštvom simptoma koji nalikuju simptomima hipogonadizma kod mlađih muškaraca, i uključuju seksualnu disfunkciju, izraženo deponovanje abdominalnog masnog tkiva, smanjenje mase mišićnog tkiva, kao i određene psihičke promene (Sampson i sar., 2007). Imajući u vidu široku lepezu fizioloških promena tokom starenja, očigledno je da ono predstavlja multifaktorijalni proces koji ne treba posmatrati samo kao posledicu snižavanja koncentracije androgena, posebno testosterona i dehidroepiandrosterona (DHEA) u cirkulaciji (Sampson i sar., 2007). Naime, starenje kod muškog pola praćeno je i sniženjem hormona rasta, insulinu sličnog faktora rasta I (IGFI), tiroksina (T₄) i melatonina (Morales, 2004; Chahal i Drake, 2007).

Slobodan testosteron u cirkulaciji predstavlja samo 2% od ukupnog testosterona, dok je 80% ovog hormona vezano za testosteron-vezujući globulin (od eng. *sex hormone binding globuline* - SHBG), a ostatak testosterona je vezan za albumin i druge proteine plazme. Veza testosterona i albumina je 1000 puta slabija nego ona sa SHBG, zbog čega testosteron brzo disosuje, postaje slobodan i lako dostupan tkivima. Tokom starenja koncentracija ukupnog testosterona se smanjuje u rasponu od 0.4 do 1% godišnje (Wu i sar., 2008). Postepeno smanjenje koncentracije ukupnog testosterona praćeno je progresivnim rastom koncentracije SHBG, što uzrokuje smanjenje nivoa slobodnog testosterona u odnosu na nivo ukupnog testosterona. Pored testosterona, kao

glavnog steroidnog hormona kod muškog pola, tokom procesa starenja snižavaju se i nivoi androgena kore nadbubrežne žlezde, DHEA i dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS). Uzrok snižavanja koncentracije testosterona u cirkulaciji nije u potpunosti objašnjen, ali je poznato da tokom procesa starenja dolazi do disfunkcije Lajdigovih ćelija i smanjenja sekrecije testosterona, kao i do smanjenja sekrecije luteinizirajućeg hormona (LH) što za posledicu ima smanjenu funkciju testisa (Kaufman i Vermeulen, 2005; Veldhuis, 2008).

Aktivnošću enzima 5α -reduktaze od testosterona nastaju dihidrotestosteron (DHT) i androstenedion, koji zajedno sa testosteronom imaju ključnu ulogu u regulaciji spermatogeneze, metabolizma kostiju, održavanju mišićne mase i funkcije mišića. Dejstvom enzima aromataze testosteron se prevodi u estradiol. Kod miševa oba pola je pokazano da usled nedostatka gena za aromatazu dolazi do povećanog gubitka koštanog tkiva, zbog povećanog stepena resorpcije kostiju (Fisher i sar., 1998; Miyaura i sar., 2001). Kod muškaraca nedostatak aromataze, usled mutacije gena za aromatazu, uzrokuje osteoporozu i odloženo sazrevanje koštanog tkiva, što biva normalizovano nakon terapije estrogenom (Bilezikian i sar., 1998), i ukazuje na esencijalnu ulogu estrogena u održavanju koštane mase.

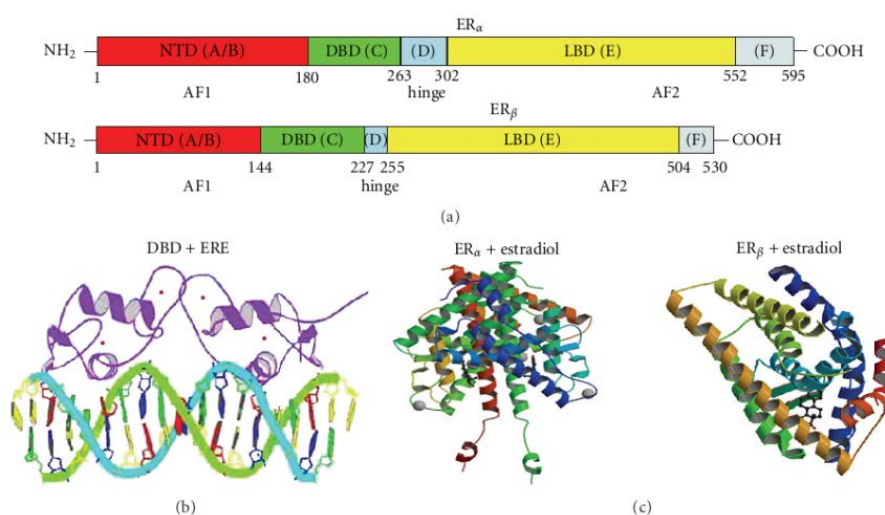
Orhidektomisani (Orx) mužjaci pacova, srednjeg životnog doba, predstavljaju dobar animalni model andropauze, koji je na početku korišćen za utvrđivanje promena na nivou koštanog tkiva (Vanderschueren i sar., 1992; Vandenput i sar., 2002), a kasnije i za utvrđivanje promena na drugim tkivima, uzrokovanih nedostatkom androgena (Šošić-Jurjević i sar., 2007; Filipović i sar., 2007; Ajdžanović i sar., 2011; Milošević i sar., 2012). Brojne studije koriste Orx pacove u istraživanjima potencijalnih terapijskih pristupa andropauzalnim simptomima (Ke i sar., 2001; Filipović i sar., 2010; 2013), sa

svrhom razumevanja regulacionih mehanizama remodeliranja koštanog tkiva (Gill i sar., 1998; Proell i sar., 2009). Literaturni podaci o regulaciji homeostaze Ca^{2+} i Pi u animalnim modelima andropauze za sada se svode na pionirske studije (Pantelić i sar., 2013).

1.2. Steroidni hormoni - mehanizmi delovanja

Estrogeni i androgeni imaju ključnu ulogu u regulaciji remodeliranja koštanog tkiva i održavanju koštane mase. Njihova koncentracija se smanjuje tokom menopauze i andropauze što uzrokuje povećanje stepena resorpcije koštanog tkiva. Pokazano je da supstituciona terapija estrogenom ima ulogu u prevenciji gubitka koštanog tkiva kod pacijenata sa postmenopauzalnom osteoporozom (Matsumoto i sar., 2006). Poznato je da svoje dejstvo estrogeni i androgeni mogu ispoljiti vezivanjem za estrogenske i androgenske receptore. Molekularni mehanizmi delovanja estrogena mogu se ostvariti njihovim vezivanjem za jedarne estrogenske receptore α i β (ER α i ER β) (Segars i Driggers, 2002), kao i za membranski estrogenski receptor (receptor kuplovan sa G-proteinom 30 - GPR30) (Revankar i sar., 2005). Vezivanje liganda za ER u citoplazmi uzrokuje konformacionu promenu receptora i ulazak formiranog kompleksa u jedro ćelije (Maruvada i sar., 2003). Kompleks ER-ligand povećava ili smanjuje ekspresiju određenih gena interakcijom sa specifičnim sekvencama DNK molekula, označenim kao DNK-vezujući domen (DBD) i koregulatornim proteinima koji stimulišu (koaktivatori) ili inhibiraju (korepresori) transkripciju specifičnih gena (Parker, 1998; Kumar i Thompson, 1999). Kao i ostali članovi superfamilije steroidnih receptora, ER se sastoji od nekoliko funkcionalnih domena, od kojih svaki nosi svoju specifičnu ulogu (Beato i sar., 1995). Od NH₂- ka -COOH-terminusu smešteni su N-terminalni domen, DBD domen, „šarka“ (*hinge*) domen, ligand vezujući domen (LBD) i -COOH terminus

(Šema 1). Na N-terminalnom domenu nalazi se aktivaciono-funkcionalni region 1 (AF1) dok se u LBD nalazi aktivaciono-funkcionalni region 2 (AF2), koji imaju ključnu ulogu u regulaciji transkripcije nakon vezivanja liganda i aktivacije estrogenskih receptora (Beato, 1989). Stepenn homologije u DBD je izuzetno visok između $ER\beta$ i $ER\alpha$ (više od 95% amino kiselina je identično), dok je procenat homologije u LBD između $ER\beta$ i $ER\alpha$ oko 55% (Kuiper i sar., 1997; Cowley i sar., 1997). D domen se nalazi nizvodno od DBD i označen je kao „šarka“ region koji je odgovoran za lokalizaciju u jedru i za povezivanju DBD i LBD domena (Kumar i sar., 2011).



Šema 1. a) Organizacija sekvenci izoformi $ER\alpha$ i $ER\beta$. N-terminalni domen - obeležen crvenom bojom, DBD - obeležen zelenom bojom, D - „šarka“ domen - obeležen plavom bojom, LBD - obeležen žutom bojom, F region lokalizovan na C-terminusu - obeležen sivom bojom. b) DNK vezujući domen estrogenskog receptora (DBD) u kompleksu sa DNK-ERE (DNK-estrogen vezujuća mesta). c) 3D strukturni prikaz interakcije $ER\alpha$ (levo) i $ER\beta$ (desno) sa estradiolom. Preuzeto od Kumar i sar., 2011.

Nakon LBD nalazi se F domen u C-terminusu, koji se sastoji od 42 amino-kiseline i ima ulogu u moduliranju genske transkripcije u zavisnosti od promotora, liganda i ćelije (Montano i sar., 1995; Koide i sar., 2007), kao i efekat na dimerizaciju receptora (Yang i sar., 2008, Šema 1).

Mehanizam delovanja estrogena može biti ostvaren i preko GPR30, membranskog estrogenog receptora, koji nakon vezivanja liganda stimuliše aktivaciju sekundarnih glasnika u ćelijama - cAMP, inozitol-tri-fosfata (IP3) i Ca^{2+} (Filardo i Thomas, 2005). Potvrđeno je da je aktivacija GPR30 nezavisna od aktivacije jedarnih estrogenih receptora, i da vezivanje liganda za GPR30 aktivira signalne puteve ERK 1/2 (od eng. *extracellular-regulated kinases 1/2*), fosfatidil inozitol 3-OH kinaze (PI3K) i protein kinaze B/AKT (Filardo i Thomas, 2005).

Androgenski receptor (AR), kao i ER pripada superfamiliji steroidnih receptora. AR funkcioniše kao ligand-zavisni transkripcioni faktor sa sposobnošću vezivanja za veliki broj gena koji kodiraju proteine i regulatorne mikro-RNK molekule (Narayanan i sar., 2010). Nakon vezivanja liganda u citoplazmi, AR ostvaruje svoj efekat u jedru interakcijom sa specifičnim androgen-vezujućim sekvencama (AREs) molekula DNK i na taj način stimuliše ili inhibira ekspresije ciljnih gena (Mangelsdorf i sar., 1995). Pored opisanog genomskog mehanizma delovanja androgena, moguć je i negenomski način delovanja. Skorašnja istraživanja (Bennett i sar., 2009; Lamont i Tindall, 2011) su pokazala da se negenomski mehanizam delovanja androgena može ostvariti posredstvom membranskih androgenskih receptora uključenih u aktivaciju unutraćelijskih signalnih puteva, dakle direktnim efektom na prenosioce signala i/ili aktivacijom kinaza (Matsumoto i sar., 2013). Molekularna struktura membranskog androgenskog receptora nije još uvek poznata, ali se spekuliše o nekoliko mogućih rešenja. Pod membranske androgenske receptore može se svrstati grupa unutraćelijskih AR lokalizovana blizu i/ili pridružena ćelijskoj membrani, koja posreduje u brzim efektima androgena sa odsustvom transkripcije (Freeman i sar., 2005), ili do sada neidentifikovan receptor kuplovan sa G-proteinom koji učestvuje u aktivaciji različitih

signalnih puteva koji rezultuju u povećanju koncentracije Ca^{2+} unutar ćelija i sintezi IP3 (Papadopoulou i sar., 2008).

Pored estrogena i androgena, bitnu ulogu u razvoju i održavanju koštanog tkiva kao i u regulaciji homeostaze Ca^{2+} ima aktivna forma vitamina D-1,25(OH)₂ (Vit D). Vit D se vezuje sa receptor za Vit D (VDR) koji pripada familiji steroidnih receptora i reguliše transkripciju ciljnih gena. Vit D u interakcijom sa VDR stimuliše apsorpciju Ca^{2+} u crevima i reapsorpciju Ca^{2+} u bubrezima (Healy i sar., 2005). Poznato je da Vit D reguliše ekspresije VDR u paraštitastim žlezdama i bubrezima, dok je uticaj na ekspresiju VDR u crevima minimalan (Brown i sar., 1995). Pokazano je da tretman Vit D smanjuje rizik od nastanka preloma kostiju kod pacijenata sa osteoporozom (Gallagher i Goldgar, 1990), a njegovo korišćenje u prevenciji i terapiji osteoporoze je široko rasprostranjeno. Dnevna preporučena doza je 1000 IU na dan (Geller i Adams, 2008). Zbog smanjenja koncentracije Ca^{2+} u cirkulaciji kod starih osoba (Nutri, 2012), uzrokovane smanjenjem unošenja Ca^{2+} i sniženom apsorpcijom u crevima, u prevenciji i lečenju osteoporoze koristi se kalcijum sam ili u kombinaciji sa Vit D (Tang i sar., 2007).

Pored korisnih efekata terapije steroidnim hormonima na koštano tkivo kao i konvencionalnih terapija Vit D i kalcijumom, postoje i neželjena dejstva njihove primene kako kod muškaraca tako i kod žena. Naime, kliničke studije su pokazale da terapije steroidnim hormonima i terapije Vit D i kalcijumom povećavaju rizik od nastanka kardiovaskularnih oboljenja, kancera dojke, hiperfosfaturije i holecistitisa kod žena (Grodstein i sar., 1994; Uemura i sar., 2000; Rossouw i sar., 2002; Nutri, 2012;). Kod muškaraca nakon terapije steroidnim hormonima povećan je rizik od nastanka hipertrofije prostate benignog karaktera, kancera prostate, hiperfosfaturije,

hepatotoskičnog efekta, hiperviskoznosti krvi, eritrocitoze i oštećenja srca (Tenover, 1999; Bassil i sar., 2009; Meng i sar., 2010).

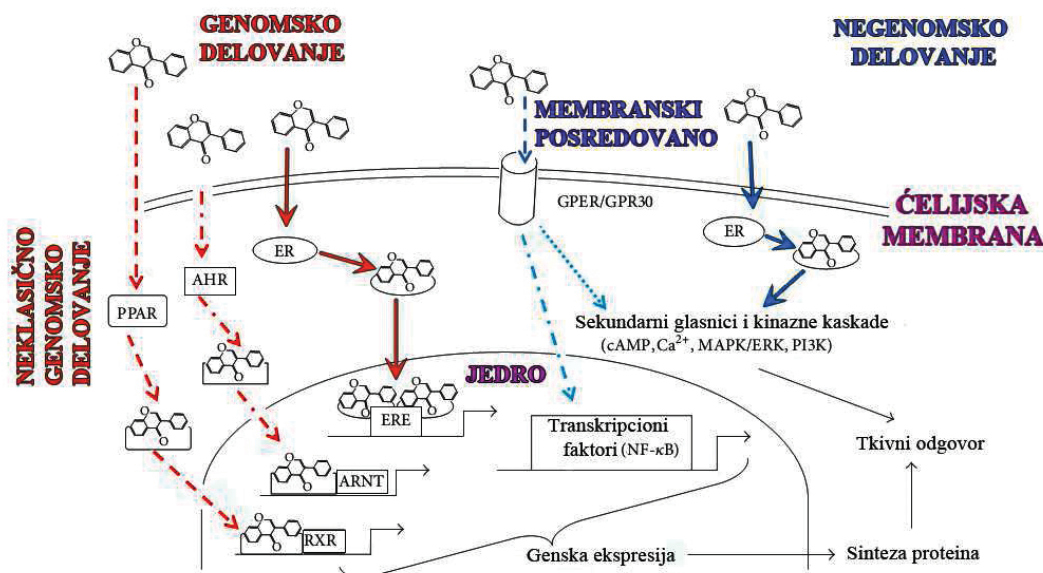
Zbog brojnih negativnih efekata primenjivanih terapija u tretmanu andropauzalnih i menopauzalnih simptoma u poslednje vreme sve je veći broj studija koje traže rešenje za prevazilaženje navedenih problema. Brojne studije ukazuju da korišćenje supstanci biljnog porekla ima značajan efekat u otklanjanju simptoma i blagotvoran uticaj na kvalitet života muškaraca u andropauzi.

1.3. Izoflavoni - mehanizmi delovanja

Tokom poslednje dve decenije, izoflavoni soje (naročito genistein i daidzein) su predmet istraživanja brojnih studija, prvenstveno zbog svog blagotvornog efekta na simptome starenja kod oba pola. Brojni literaturni podaci svedoče o korisnom efektu izoflavona soje u tretmanu kancera dojke i prostate, osteoporoze, srčanih oboljenja, kao i psiholoških simptoma koji su povezani sa starenjem (Casini i sar., 2006; Messina, 2010a; Messina i sar., 2010a; Andres i sar., 2011). Po hemijskoj strukturi izoflavoni su triciklična bifenolna jedinjenja, koja su u prirodnim izvorima uglavnom prisutna u vidu glikozilovanih formi.

Potvrđeno je da izoflavoni soje ostvaruju brojna biološka dejstva, koja je Barnes (2010) klasifikovao u nekoliko grupa: vezivanje za jedarne steroidne receptore, inhibicija tirozin kinaza i enzima uključenih u biosintezu steroidnih hormona, antioksidativno delovanje, uticaj na imunski sistem i inhibitorni efekat na širenje metastaza. Preciznija, mehanicistička klasifikacija dejstava izoflavona soje ukazuje na činjenicu da oni svoje efekte ostvaruju i kroz regulaciju ćelijskog ciklusa i indukovanje apoptoze (Zhang i sar., 2001; Dixon i Ferreira, 2002), zatim na funkcionisanje

mitohondrija (Duluc i sar., 2012), gensku ekspresiju, funkcionisanje signalnih puteva i aktivaciju enzima usled povećanja koncentracije cAMP (Šema 2).



Šema 2. Prikaz mogućih mehanizama delovanja fitoestrogena. AHR - aril hidrokarbonski receptor, ARNT - AHR jedarni translokator, ER - estrogenski receptor, ERE - estrogen vezujuće sekvence elementi, cAMP - ciklični adenzin monofosfat, Ca^{2+} - jon kalcijuma, GPER/GPR30 - G protein kuplovani estrogenski receptor 1, MAPK/ERK - mitogen aktivirajuće protein kinaze/vanćelijskim signalima regulisane kinaze, NF- κ B - (od eng. *nuclear factor kappa of activated B cells*), PI3K - fosfatidilinozitol 3 kinaze, PPAR - (od eng. *peroxisome-proliferator activating receptor*), RXR retinoidni receptor X. Modifikovano od Woclawek-Potocka i sar., 2013.

Usled strukturne sličnosti sa 17β estradiolom, izoflavoni se vezuju za ER α i ER β (Kuiper i sar., 1997), kao i za androgenski i progesteronski receptor (Beck i sar., 2005; Kalaiselvan i sar., 2010). Takođe, izoflavoni soje se vezuju i za nesteroidne jedarne receptore kao što su PPAR (od eng. *peroxisome-proliferator activating receptor*) (Mezei i sar., 2003) i *orphan* receptor (Hirvonen i sar., 2011). Izoflavoni mogu stimulisati ili inhibirati ekspresije nekoliko bitnih klasa gena odgovornih za regulaciju transkripcije, signalne transdukcije, imunskog odgovora kao i drugih regulatornih funkcija (Aalinkeel i sar., 2010). Do danas nije utvrđeno vezivanje izoflavona za

glukokortikoidni receptor i tiroidne $\alpha 1$ i $\beta 1$ receptore (Takeuchi i sar., 2009). Potvrđeno je da izoflavoni inhibiraju: translokaciju NF- κ B (od engl. *nuclear factor kappa of activated B cells*) iz citoplazme u jedro ćelije (Li i sar., 2011), aktivnost matriksnih metaloproteinaza-2 i -9 (MMP-2 i -9) (Huang i sar., 2005; Li i sar., 2006), tirozin- i Akt-kinaza (Akiyama i sar., 1987; Li i sar., 2011), 3β -HSD i citohrom P-450 21-hidroksilaze (Ohno i sar., 2002, 2003), i tiroperoksidaze (Divi i sar., 1997); stimulišu aktivaciju protein kinaze A (Liu i sar., 2006), te mogu dvojako delovati na aktivnost kinaze fokalnih adhezija (FAK) (Sawai i sar., 2005; Azios i Dharmawardhane, 2005), a inhibiraju aktivnost Ca^{2+} - kanala (Yokoshiki i sar., 1996). Bifenolna struktura izoflavona omogućava heliranje tranzicionih metala (Arora i sar., 2000), kao i uklanjanje slobodnih radikala (Chen i sar., 2002; Kruk i sar., 2005) što predstavlja osnovu antioksidativnog delovanja izoflavona.

Izoflavoni genistein i daidzein su prepoznati kao veoma delotvorni alternativni terapeutici kancera, kardiovaskularnih oboljenja i osteoporoze, te kao eliminatori oksidativnog stresa. Dakle nalaze svoju ulogu u ublažavanju brojnih simptoma koji karakterišu andropauzu i menopauzu (Vitale i sar., 2013).

Peterson i Barnes (1996) su u svojoj studiji pokazali da genistein ima inhibitorno dejstvo na rast ćelija kancera dojke nakon stimulacije estrogenom. Takođe je utvrđeno da genistein ostvaruje inhibitorni efekat i na ćelije kancera dojke koje ne poseduju ER, što ukazuje da genistein može svoju aktivnost ispoljiti i receptorskim i ne-receptorskim mehanizmima (Banerjee i sar., 2008). Anti-kancerogeno delovanje genisteina potvrđeno je na različitim animalnim modelima i tumorskim ćelijskim linijama leukemija, limfoma, kancera jajnika i grlića materice, melanoma, neuroblastoma, karcinoma želuca, pankreasa, dojki i prostate (Jamadar-Shroff i sar., 2009; El Touny i Banerjee,

2009). Svoje anti-kancersko delovanje genistein ostvaruje inaktivacijom NF- κ B preko smanjenja kinazne aktivnosti MEKK1, inhibicijom ERK1/2, smanjivanjem stepena fosforilacije p90RSK i Akt signalnih puteva, regulacijom ekspresije proteina uključenih u proces apoptoze kao što su Bcl-2, Bcl-xL, BAX, i inhibicijom aktivnosti proteozoma (Gong i sar., 2003; Banerjee i sar., 2005; Kang i sar., 2007; Li i sar., 2008a, 2008b; Gwin i sar., 2011). Takođe, ekspresija telomerazne reverzne transkriptaze, iRNK za c-myc i MDM2 onkogeni, te MMP-2 i -9 je smanjena pod dejstvom genisteina, dok je iRNK za p21 povećana u DU-145 i LNCaP ćelijskim linijama kancera prostate (Huang i sar., 2005; Ouchi i sar., 2005; Li i sar., 2005; Li i sar., 2006; Xu i Bergan, 2006).

Aplikovani izoflavoni mogu u značajnoj meri regulisati lipidni status, jer je pokazano da snižavaju koncentraciju lipida i lipoproteina u plazmi kod muškaraca i žena, i izazivaju vazodilataciju krvnih sudova čime olakšavaju protok krvi (Clarkson, 2002). Studija Šošić-Jurjević i saradnika (2007) pokazuje da je kod Orx mužjaka pacova nivo holestreola u serumu smanjen nakon primene izoflavona, ali da je nivo triglicerida povećan. Genistein uzrokuje azot oksid (NO)-zavisnu dilataciju krvnih sudova, zbog čega se može smatrati novim potencijalnim terapeutikom u lečenju hipertenzije, i u primarnoj i sekundarnoj prevenciji ateroskleroze (Walker i sar., 2001). Daidzein, sa druge strane, uzrokuje vazorelaksaciju povećavajući provodljivost Ca²⁺-zavisnih K⁺-kanala u glatkim mišićnim ćelijama zida krvnih sudova (Zhang i sar., 2010). Studija Ajdžanović i saradnika (2010) pokazuje da genistein smanjuje fluidnost membrane eritrocita u površinskom regionu, dok daidzein povećava fluidnost u dubini membrane, što za posledicu ima negativne (genistein) i pozitivne (daidzein) efekte na reološke karakteristike eritrocita i viskoznost krvi.

Pored direktnog antioksidativnog delovanja izoflavona, usled dominacije fenolnih prstenova u njihovoj strukturi, oličenog u uklanjanju slobodno-radikalnih vrsta kiseonika i smanjivanju oksidativnog stresa, poznato je da genistein antioksidativni efekat ostvaruje i stimulacijom aktivacije ERK 1/2 signalnog puta i ekspresije gena za Mn-superoksid dismutazu (MnSOD) u MCF-7 ćelijskoj liniji kancera dojke (Borras i sar., 2006). Ekvol, biološki aktivna forma daidzeina koja nastaje aktivnošću crevne flore (Setchell i sar., 2003), smanjuje oksidativni stres i povećava aktivnost katalaze i superoksid dismutaze (SOD) u jetri miševa (Choi, 2009). Takođe, inhibitoran efekat ekvola na produkciju NO ostvaruje se preko aktivacije Akt i inhibicije NFκB signalnih puteva (Kang i sar., 2007).

Protektivan efekat genistein ispoljava i na koštano tkivo kako kod ovarijektomisanih ženki pacova, tako i kod postmenopauzalnih žena. Ovaj efekat genistein ostvaruje inhibicijom aktivnosti osteoklasta i stimulacijom osteoblasta (Morabito i sar., 2002; Bitto i sar., 2008). De Wilde i saradnici (2006) su pokazali da daidzein može ostvariti svoj efekat na kosti aktivacijom signalnih puteva nezavisnih od ERβ. Naime, tretman ćelijske kulture osteoblasta daidzeinom uzrokovao je brzu fosforilaciju i aktivaciju ERK 1/2 signalnog puta i promene u aktinskom citoskeletu, što sugeriše o stimulatornom efektu daidzeina na diferencijaciju i proliferaciju osteoblasta (De Wilde i sar., 2006). U animalnom modelu osteoporoze, tretman daidzeinom deluje stimulatorno na aktivnost C ćelija štitnjače i ima protektivan efekat na koštano tkivo kod Ovx i Orx pacova (Somjen i sar., 2008; Filipović i sar., 2010).

Uticaj izoflavona na ključne regulatore homeostaze Ca²⁺ i Pi u animalnom modelu andropauze je slabo istražen, o čemu svedoče malobrojne studije (Pantelić i sar., 2013). Literaturni podaci ukazuju na štetne efekte korišćenje terapije steroidnim hormonima,

kao i kombinacijom Vit D i kalcijuma u prevenciji i tretmanu simptoma andropauze (Bassil i sar., 2009; Meng i sar., 2010), te stoga izoflavoni predstavljaju perspektivna pomoćna lekovita sredstva. Uzimajući u obzir potvrđene mehanizme delovanja izoflavona opravdana je pretpostavka o njihovom mogućem efektu na strukturu i funkciju organa i receptora uključenih u regulaciju homeostaze Ca^{2+} i Pi.

1.4. Paraštitaste žlezde

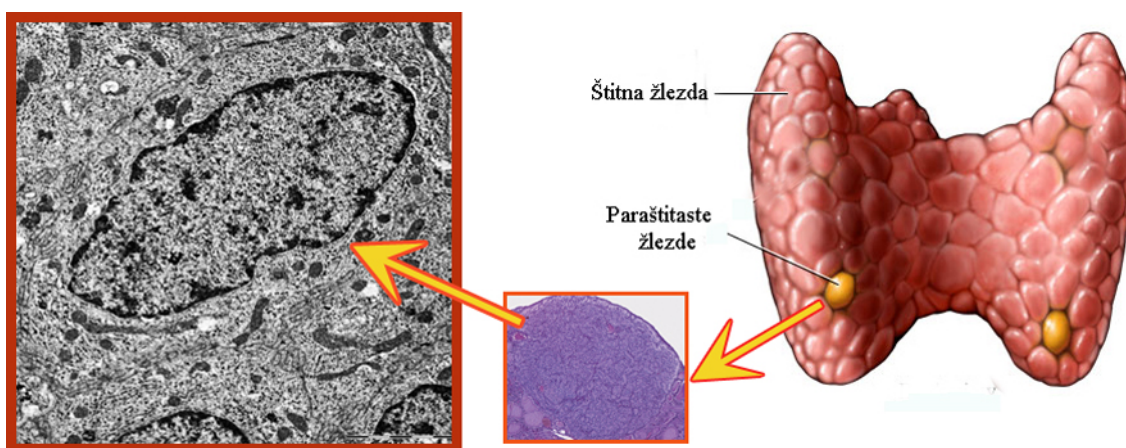
Paraštitaste žlezde nastaju od endodermalnih ždrelnih džepova, kod ljudi od trećeg i četvrtog, dok kod miševa samo od trećeg ždrelnog džepa (Okabe i Graham, 2004). Studije na miševima su pokazale da je transkripcioni factor *Gcm-2* ključni regulator embrionalnog razvoja paraštitastih žlezda. Ekspresija ovog gena ograničena je samo u paraštitastim žlezdama, i u slučaju njegove mutacije ne dolazi do formiranja ovih žlezda (Kim i sar., 1998; Gunther i sar., 2000; Gordon i sar., 2001). Međutim, kod riba ne postoje paraštitaste žlezde i parathormon (PTH), jer ove životinje Ca^{2+} usvajaju sa vodom iz spoljašnje sredine. Prelaz iz akvatične u terestričnu životnu sredinu nameće nove kontrolne mehanizme regulacije homeostaze Ca^{2+} , pa je stoga evolucija paraštitastih žlezda i stvaranje PTH ključni događaj koji je olakšao tranziciju iz akvatične u terestričnu sredinu (Okabe i Graham, 2004). Studija ovih autora je pokazala da škrge i paraštitaste žlezde imaju isto evolutivno poreklo, naime oba organa ekspimiraju *Gcm-2* (koji je neophodan za pravilan razvoj), PTH i CaSR, što sugerise da su od škrge verovatno nastale paraštitaste žlezde tetrapoda.

Paraštitaste žlezde su parni endokrini organi. Kod pacova je prisutan jedan par, dok kod ljudi postoji dva para paraštitastih žlezda, označenih kao gornje i donje. Smeštene su u lobusima štitaste žlezde, ali su sopstvenom vezivnom kapsulom odvojene od okolnog tkiva. Svaka paraštitasta žlezda kod čoveka je dužine oko 5 mm, širine 3

mm i debljine 1-2 mm, a njena težina iznosi oko 130 mg. Veličina žlezde je određena, osim uzrastom, i metaboličkim statusom Ca^{2+} u organizmu.

Strukturno posmatrano, paraštitaste žlezde se sastoje od strome i parenhima. Stromu žlezda čine kapsula, izgrađena od umereno gustog vezivnog tkiva, i vezivne septe koje se uvlače duboko u parenhim žlezde. Kapsula i septe nose krvne sudove i nervna vlakna. Parenhim žlezde grade dva tipa ćelija: glavne i oksifilne ćelije.

Glavne ćelije paraštitastih žlezda su najčešće organizovane u trake ili grupe, uz i oko krvnih kapilara fenestrovanog tipa (Šema 3).



Šema 3. Elektronske mikrofografije glavnih ćelija paraštitastih žlezda. A) Organizacija glavnih ćelija paraštitastih žlezda oko krvnog suda, bar-10 μm . B) Ultrastruktura glavnih ćelija paraštitastih žlezda, bele strelice - interdigitacije ćelijske membrane, crna strelica - mitohondrije, crvena strelica - granulisani endoplazmin retikulum (gER), zelena strelica-Goldžijev kompleks, n-nukleus, KS-krvni sud; bar-2 μm .

Međusobno su povezane pukotinastim spojevima i dezmozomima, ovalnog su oblika, sa centralno postavljenim okruglim ili izduženim jedrom. Membrana glavnih ćelija formira mnogobrojne interdigitacije i uvrte koji prema Coleman-u i Silberman-u (1978) predstavljaju odraz njihove aktivnosti i sekrecije PTH. U citoplazmi se uočavaju dobro razvijen granulisani endoplazmin retikulum (gER) i Goldžijev kompleks, kao i brojne mitohondrije (Šema 3). U uzanim perikapilarnim prostorima nalaze se retka kolagena i retikularna vlakna, kao i završeci nemijelinizovanih nervnih vlakana.

Oksifilne ćelije su veće od glavnih ćelija paraštitaste žlezde, poliginalnog su oblika i imaju centralno postavljeno okruglo jedro. Citoplazma im je izrazito acidofilna zbog velikog broja mitohondrija i njihovih enzima, a između mitohondrija se nalaze u manjoj meri slobodni ribozomi, granule glikogena, malobrojni lizozomi i slabo razvijeni gER i Goldžijev aparat. Oksifilne ćelije se retko nalaze pre puberteta i njihov broj se povećava sa starenjem. Ove ćelije ne sekretuju hormon i njihova funkcija nije jasna. Smatra se da predstavljaju određeni stepen diferencijacije glavnih ćelija, odnosno da nastaju njihovim starenjem. Kod pacova oksifilne ćelije nisu prisutne tako da paraštitaste žlezde imaju samo jednu ćelijsku populaciju, glavne ćelije.

PTH (90 kD) je peptidni hormon koji se sastoji od 84 amino-kiseline i njegov poluživot u citoplazmi je izuzetno kratak. Hormon se sintetiše u formi *prepro*-PTH od koga nastaje *pro*-PTH koji ima 6 aminokiselina u višku na N-terminusu u odnosu na kranji produkt. Konverzija *pro*-PTH u PTH molekul se dešava 15-20 minuta nakon sinteze, kada *pro*-PTH dospe do Goldži kompleksa. Gen za PTH je izolovan i određena mu je sekvenca kod 10 životinjskih vrsta, a nalazi se na malom kraku hormozoma 11. On poseduje dva introna koji imaju istu poziciju kod svih vrsta, a razdvajaju ih tri egzona koji kodiraju *prepro*-PTH. PTH je evolutivno visoko konzerviran hormon poredeći sekvencu njegovog molekula među različitim vrstama. *Prepro*-PTH se teško detektuje u glavnim ćelijama paraštitastih žlezda (Bell i sar., 2005). Sa starenjem koncentracija PTH u cirkulaciji se povećava kod ljudi i pacova, kao i volumen paraštitastih žlezda, što izaziva gubitak koštane mase i pogoduje razvoju osteoporoze (Halloran i sar., 2002).

Paraštitaste žlezde imaju ključnu ulogu u regulaciji homeostaze vanćelijskog Ca^{2+} , što je od izuzetnog značaja jer je Ca^{2+} neophodan za odvijanje brojnih fizioloških

procesa, poput mišićne kontrakcije, koagulacije krvi, i sinaptičke aktivnosti. Ove žlezde detektuju promene u koncentraciji Ca^{2+} u krvi pomoću receptora osetljivog za Ca^{2+} (CaSR) koji reguliše sekreciju parathormona (PTH) (Brown, 2001).

1.4.1. Regulacija funkcije paraštitastih žlezda

Sinteza i sekrecija PTH regulisane su nivoom Ca^{2+} u krvi i aktivnošću lizozoma u glavnim ćelijama paraštitastih žlezda. Naime, nizak nivo Ca^{2+} stimuliše sekreciju PTH, dok se kod visokog nivoa Ca^{2+} u krvi PTH ne sekretuje. Kao odgovor na visok nivo Ca^{2+} , lizozomski enzimi u glavnim ćelijama vrše digestiju granula (krinofagija), čime se sprečava oslobađanje PTH. Parathormon ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze Ca^{2+} i Pi u cirkulaciji tako što stimuliše oslobađanje Ca^{2+} i Pi iz kostiju, smanjuje ekskreciju Ca^{2+} u bubregu, povećava ekskreciju Pi u bubregu i stimuliše aktivnost $1,\alpha$ -hidroksilaze, enzima koji učestvuje u sintezi aktivne forme vitamina D u bubregu.

Paraštitaste žlezde detektuju male promene u koncentraciji Ca^{2+} , koji aktivira CaSR, transmembranski receptor kuplovan sa G-proteinom (Brown i sar., 1999). CaSR poseduje veliki vanćelijski domen pomoću koga detektuje promene u koncentraciji Ca^{2+} zahvaljujući kiselim aminokiselinskim ostacima. Ca^{2+} vezan za CaSR pokreće kaskadu unutarćelijskih odgovora, koji ne samo da imaju ulogu u inhibiciji sekrecije nego i učestvuju u razgradnji sintetisanog PTH (Habener i Potts, 1990). Kada je koncentracija Ca^{2+} u cirkulaciji niska, CaSR se nalazi u relaksiranom stanju i tada se PTH veoma brzo sekretuje iz glavnih ćelija paraštitastih žlezda. Glavne ćelije su programirane da kontinuirano sekretuju PTH, tako da CaSR ima ulogu brane, odnosno predstavlja barijeru koja zaustavlja ovaj proces. Malobrojne sekretorne granule koje sadrže PTH u citoplazmi glavnih ćelija, u poređenju sa ostalim tipovima endokrinih ćelija, idu u prilog hipotezi o kontinuiranoj sekreciji (Habener, 1981; Wernerson i sar., 1991). Veliki udeo

u regulaciji aktivnosti glavnih ćelija paraštitastih žlezda odnosi se na degradaciju formiranog PTH u ćelijama. U uslovima hiperkalcemije, više od 90% PTH se degraduje u glavnim ćelijama, što rezultuje nastankom -COOH terminalnih fragmenata koji se mogu otpustiti u citoplazmu ili se degradovati u ćelijama, pri čemu se reciklirane amino- kiseline poreklom iz PTH koriste u sintezi drugih proteina u ćeliji (Chu i sar., 1973).

CaSR koji je aktiviran visokom koncentracijom, prenosi informaciju do sekretorne mašinerije za PTH pomoću fosfolipaze C (PLC), a potom indirektno i do fosfolipaza D (PLD) i A₂ (PLA₂) (Kifor i sar., 1997). PLD deluje na fosfolipide i uzrokuje oslobađanje biološki aktivnog jedinjenja fosfatidinske kiseline. PLA₂ deluje na membranske fosfolipide i dolazi do oslobađanja arahidonske kiseline (AA) koja se metaboliše do aktivnih leukotrijena koji inhibiraju sekreciju PTH (Silver i sar., 2002). Bourdeau i saradnici (1992; 1994) su pokazali da visoka koncentracija vanćelijskog Ca²⁺ povećava stepen oslobađanja AA iz glavnih ćelija paraštitastih žlezda i da dodavanje AA ili njenih metabolite ima inhibitoran efekat na sekreciju PTH. Kifor i saradnici (2001) su u svojim istraživanjima proučavali efekat CaSR na aktivaciju MAPK signalnog puta. Svoja istraživanja sprovedli su na glavnim ćelijama paraštitastih žlezda govečeta i na HEK293 (*Human Embryonic Kidney cells 293*) ćelijama transfekovanim sa CaSR. CaSR aktivira G_{q/11}-fosfatidilinozitol-PLC signalni put, koji stimuliše aktivaciju protein kinaze C (PKC), kao i G_i signalni put što uzrokuje smanjenje aktivnosti protein kinaze A (PKA) i aktivaciju tirozin kinaze. Povećana vanćelijska koncentracija Ca²⁺ glavni je aktivacioni signal CaSR-a, koji uzrokuje fosforilaciju i aktivaciju ERK 1/2 signalnog puta. Korišćenjem specifičnih inhibitora potvrđeno je da je efekat CaSR na aktivaciju MAPK signalnog puta posredovan preko

G_i tirozin kinaze i preko G_{q/11}-fosfatidilinozitol-PLC signalnih puteva (Kifor i sar., 2001). Takođe, ista istraživačka grupa je pokazala da se -COOH domen CaSR vezuje za filamin A, što sugeriše da je ovaj receptor lokalizovan u kaveolama, povezan sa aktinskim citoskeletom i da učestvuje u aktivaciji MAPK (od eng. *mitogen activated protein kinase*) signalnog puta (Hjalm i sar., 2001).

Fundamentalna studija Ben-Dov i saradnika (2007) prva je ukazala na postojanje povratne sprege između koštanog tkiva i paraštitastih žlezda, u kojoj su paraštitaste žlezde okarakterisane kao novi ciljni organ za fibroblastni faktor rasta 23 (FGF23). Osteoblasti i osteociti sintetišu i sekretuju FGF23 kao odgovor na visoku koncentraciju Pi u serumu (Riminucci i sar., 2003; Liu i sar., 2006; Pereira i sar., 2009). Ulogu u regulaciji funkcije glavnih ćelija paraštitastih žlezda FGF23 ostvaruje vezivanjem za kompleks FGF receptor1c-Klotho receptor (FGFR-Klotho). Ekspresija Klotho koreceptora odražava tkivnu specifičnost za FGF23. Klotho transmembranski protein se nalazi u paraštitastim žlezdama, distalnim tubulima bubrega, hipofizi i sinoatrijalnom čvoru srca (Takeshita i sar., 2004). Ben-Dov i saradnici (2007) su pokazali da paraštitaste žlezde eksprimiraju Klotho protein i da FGF23 deluje inhibitorno na transkripciju iRNK za PTH, kao i na sekreciju PTH. Vezivanje FGF23 za FGFR-Klotho receptor kompleks izaziva inhibitoran efekat na sintezu i sekreciju PTH, koji se ostvaruje aktivacijom MAPK i ERK 1/2 signalnih puteva (Ben-Dov i sar., 2007). Kod pacijenata na hemodijalizi nivo FGF23 u cirkulaciji može dostići ekstremne vrednosti (Larsson i sar., 2003; Gutierrez i sar., 2005) iako je koncentracija PTH takođe visoka, što ukazuje da FGF23 i nije toliko potentan u inhibiciji sinteze i sekrecije PTH. Međutim, Canalejo i saradnici (2010) u svojoj studiji o uticaju FGF23 na funkciju paraštitastih žlezda, kod normalnih i uremičnih mužjaka pacova, pokazuju da je za

izostanak inhibitornog efekta FGF23 na sintezu i sekreciju PTH kod uremičnih životinja odgovorna izuzetno smanjena ekspresija FGFR i Klotho receptora u glavnim ćelijama paraštitastih žlezda.

Prisustvo ER u glavnim ćelijama paraštitastih žlezda i dalje je kontroveržno pitanje (Naveh-Many i sar., 1992; Carillo-Lopez i sar., 2009). Prema studiji Carillo-Lopez i saradnika (2009) paraštitaste žlezde ne ekspimiraju ER, ali je funkcija ovih žlezda regulisana estrogenom. Naime, terapija estrogenom snižava koncentraciju PTH kod postmenopauzalnih žlezda i stimuliše formiranje koštanog tkiva (Khosla i sar., 1997; Stock i sar., 1985). Skorašnja studija sugeriše da je efekat estrogena na paraštitaste žlezde indirektan i da je posredovan verovatno FGF23 (Carillo-Lopez i sar., 2009).

Vit D reguliše aktivnost paraštitastih žlezda vezujući se za VDR u glavnim ćelijama i na taj način u velikoj meri inhibira sintezu iRNK za PTH (Silver i sar., 1986). Povećana koncentracija Vit D deluje stimulatorno na ekspresiju VDR u glavnim ćelijama paraštitastih žlezda (Naveh-Many i sar., 1990).

1.5. Bubrezi

Bubrezi su parni organi, smešteni retroperitonealno na zadnjem zidu abdomena. Svaki bubrež se sastoji od kore (*cortex*) i srži (*medulla*) u kojoj se uočavaju medularne piramide. Osnovna strukturna i funkcionalna jedinica bubrežga je nefron, koga čine bubrežno telašće, proksimalni izuvijanu tubul, debeli i tanki delovi Henleove petlje i distalni izuvijani tubul. Sabirni kanalići ne smatraju se sastavnim delovima nefrona (Junqueira i Carneiro, 2005).

Bubrežno telašce se sastoji od glomerula, klupka krvnih kapilara, okruženog dvoslojnom epitelnom kapsulom koja se zove glomerularna Boumanova kapsula. Između dva lista Boumanove kapsule nalazi se urinarni prostor u koji se kroz zid kapilara i visceralni list filtrira krvna plazma. Svako bubrežno telašce renalni korpuskul ima vaskularni pol gde ulazi aferentna i izlazi eferentna arteriola, i urinarni pol od kojeg polazi proksimalni izuvijani tubul.

Na urinarnom polu glomerula pločast epitel parijetalnog lista Boumanove kapsule prelazi u cilindričan epitel proksimalnog izuvijanog tubula. Apikalni region ćelija proksimalnih tubula sadrži brojne mikrovili koji čine četkastu pokrovnu ivicu. Apikalna citoplazma sadrži brojne vezikule između baza mikrovila, koje povećavaju kapacitet tubularnih ćelija za apsorpciju makromolekula. Ćelije ovih tubula imaju acidofilnu citoplazmu jer sadrže brojne izdužene i vertikalno usmerene mitohondrije lokalizovane u bazalnom delu, u uvratima ćelijske membrane. Ovakav položaj mitohondrija i povećanje površine ćelijske membrane mnogobrojnim invaginacijama predstavljaju karakteristike ćelija koje učestvuju u aktivnom transportu jona. Glomerularni filtrat ulazi u proksimalni izuvijani tubul u kome se obavlja reapsorpcija aminokiselina i glukoze, Pi i Ca^{2+} , vode i natrijum-hlorida (Junqueira i Carneiro, 2005).

Približno 1/7 svih nefrona bubrega je smeštena blizu kortikalnomedularne granice, te se stoga nazivaju jukstamedularni nefroni, a ostali nefroni su kortikalni nefroni. Jukstamedularni nefroni su najvažniji za stvaranje hipertoničog urina, jer imaju vrlo dugačke Henleove petlje koje se protežu duboko u medulu. Henleova petlja ima oblik latiničnog slova U i sastoji se od debelog nishodnog, tankog nishodnog, tankog ushodnog i debelog ushodnog dela na koji se nastavlja distalni tubul (Junqueira i Carneiro, 2005).

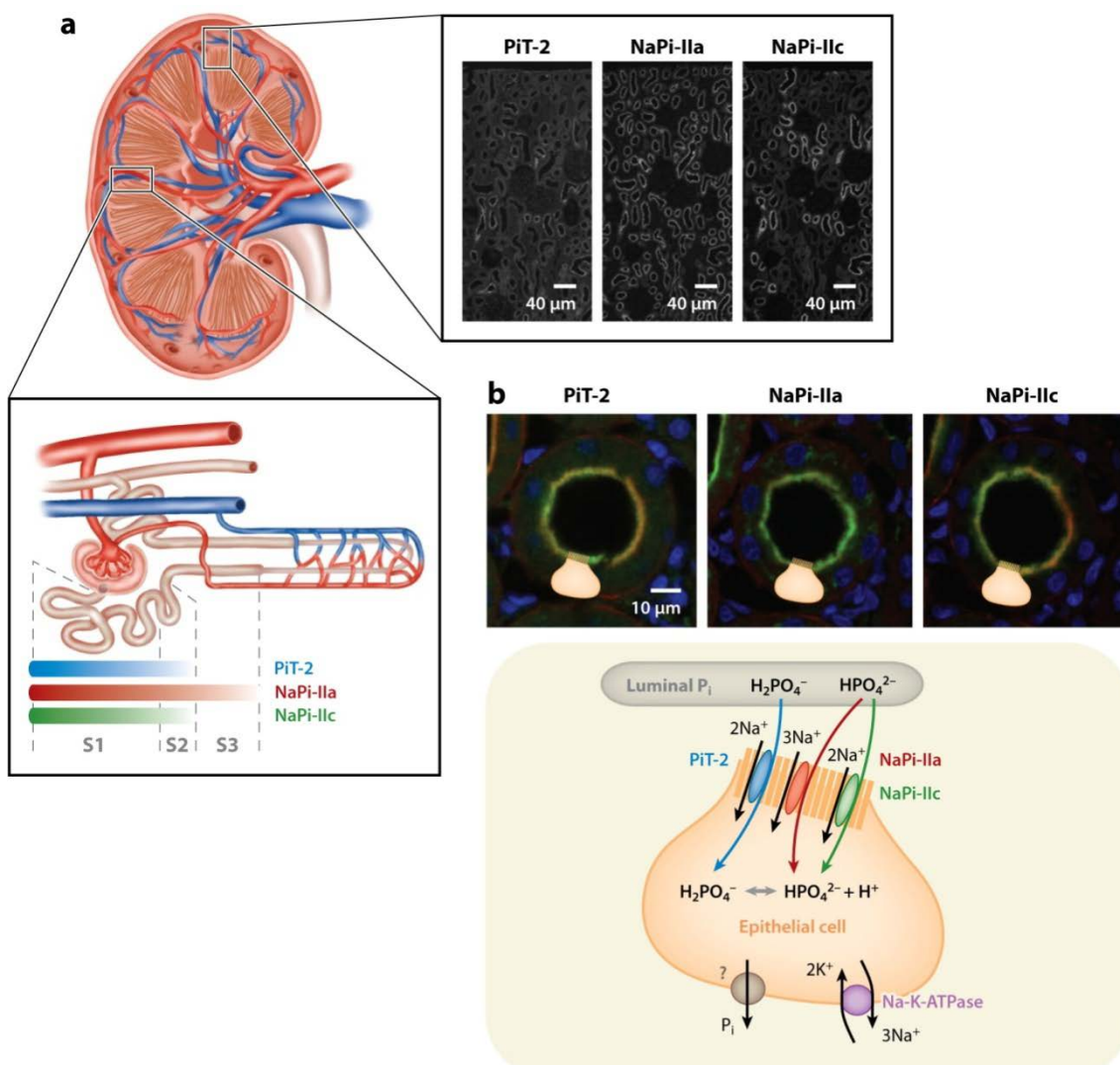
Distalni izuvijani tubul obložen je jednoslojnim kockastim epitelom, a ćelije ovih tubula su manje od ćelija proksimalnih tubula, nemaju četkastu ivicu i ne poseduju apikalne vezikule. U svom toku distalni izuvijani tubul dolazi u kontakt sa vaskularnim polom bubrežnog telašca svog nefrona. Na mestu ovog kontakta distalni tubul se modifikuje kao i aferentna arteriola. U ovom jukstamedularnom području ćelije distalnog tubula postaju cilindrične, a njihova jedra blisko približena jedno uz drugo i formiraju strukturu koja se zbog izgleda pod svetlosnim mikroskopom označava kao *macula densa*. Na distalni tubul nastavlja se sabirni kanalić (Junqueira i Carneiro, 2005).

Jukstaglomerularni aparat se sastoji od izmenjenih glatkih mišićnih ćelija tunike medije aferentne arteriole koje se nazivaju jukstamedularne ćelije (Junqueira i Carneiro, 2005). Ove ćelije sintetišu i sekretuju renin, enzim koji deluje na angiotenzinogen, protein plazme koji se sintetiše u jetri, a pod dejstvom renina konvertuje u inaktivni dekaeptid nazvan angiotenzin I. Dejstvom angiotenzin-konvertujućeg enzima, koga sintetišu endotelne ćelije pluća, angiotenzin I gubi dve amino-kiseline i prelazi u aktivan oktapeptid angiotenzin II. Angiotenzin II povećava krvni pritisak na dva načina: direktnom konstrikcijom perifernih krvnih sudova ili indirektnim mehanizmom, tj. stimulacijom zone glomeruloze kore nadbubrežnih žlezda koja reaguje lučenjem aldosterona. Aldosteron povećava eliminaciju jona K^+ i reapsorpciju jona Na^+ i vode u distalnom izuvijanom tubulu, te se povećava volumen cirkulišuće krvi i krvni pritisak (Junqueira i Carneiro, 2005). Skorašnji podaci ukazuju na postojanje CaSR u jukstaglomerularnim ćelijama i da aktivacija CaSR deluje inhibitorno na sekreciju renina tako što smanjuje aktivnost adenilat ciklaze i stimuliše aktivaciju kalcijum/kalmodulin fosfodiesteraze (Ortiz-Capisano i sar., 2007).

1.5.1. Reapsorpcija Pi u bubregu

Regulacija homeostaze Pi se postiže balansom unošenja Pi hranom i gubljenjem tj. izbacivanjem Pi urinom i fecesom, najviše u procesu regulisane aktivne reapsorpcije Pi iz glomerularnog filtrata. U fiziološkim uslovima oko 80% filtriranog Pi se reapsorbuje u proksimalnim tubulima, dok za reapsorpciju Pi u distalnim tubulima i dalje nema jasnih dokaza, tako da proksimalni tubuli predstavljaju glavno kontrolno mesto regulacije homeostaze Pi (Biber i sar., 2013). Ukupna količina Pi koji se reapsorbuje duž proksimalnog tubula određena je brojem različitih kotransportera koji se nalaze u oblasti četkaste ivice epitelnih ćelija, i razlikuju se u zastupljenosti kao i pojedinačnom doprinosu reapsorpciji Pi (Biber i sar., 2013). Reapsorpcija Pi je regulisana brojnim hormonalnim i metaboličkim faktorima, koji pojedinačno ili sinhronizovano, menjaju broj natrijum-fosfatnih kotransportera (NaPi) na apikalnoj membrani epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega. Signalni putevi uključeni u regulaciju NaPi kotransportera razlikuju se u zavisnosti od aktivatora tj. modulatora aktivnosti NaPi kotransportera. Transport Pi kroz apikalnu membranu epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega zahteva prisustvo jona Na^+ (Šema 4). Transport Pi uz elektrohemijski gradijent zavisi od transporta Na^+ niz elektrohemijski gradijent (Forster i sar., 2006; Biber i sar., 2009).

Na^+ -zavisni kotransporteri Pi, koji se nalaze na apikalnoj strani epitelnih ćelija proksimalnih tubula, pripadaju SLC34 (SLC34A1 ili NaPi 2a, SLC 43A3 ili NaPi 2c) ili SLC20 (SCL20A2 ili PiT-2) familiji nosača (Šema 4). Bazolateralno lokalizovani proteini koji su odgovorni za efluks Pi iz epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega nisu do sada okarakterisani (Biber i sar., 2013).



Šema 4. Distribucija i lokalizacija transportnih proteina Pi u nefronu. a) poprečni presek bubrega (levo) i imunofluorescentno obeleženi PiT-2, NaPi 2a i NaPi 2c (umetak desno). Umetak dole - imunofluorescencijom potvrđeno je da je NaPi 2a kotransporter lokalizovan celom dužinom proksimalnog tubula kortikalnih i jukstamedularnih nefrona, dok su NaPi 2c i PiT lokalizovani pretežno u S1 segmentu proksimalnih tubula. b) PiT-2, NaPi 2a i NaPi 2c su kolokalizovani na četkastoj pokrovnoj membrani. PiT-2, NaPi 2a, i NaPi 2c (obeleženi zeleno), aktin (obeleženi crveno). Panel niže sumira put reapsorpcije Pi u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega. NaPi 2a i NaPi 2c transportuju divalentni Pi (HPO_4^{2-}), dok PiT-2 transportuje jednovalentni Pi (H_2PO_4^-). Bazolateralni transporter Pi nije identifikovan. Bazolateralno lokalizovana Na-K-ATPaza održava gradijent jona Na^+ u ćelijama proksimalnih tubula koji omogućava transport. Preuzeto od Biber i sar., *Annu Rev Physiol* 75: 535–50, 2013.

NaPi 2a je najzastupljeniji u jukstamedularnim nefronima, i njegova ekspresija se smanjuje duž proksimalnog tubula, dok su NaPi 2c i PiT 2 najviše zastupljeni u S1 segmentu tubula (Šema 4). Proteini SLC34 familije nosača mogu se podeliti na osnovu sposobnosti generisanja električnog potencijala, pri čemu je NaPi 2a elektrogen, dok je NaPi 2c elektroneutralan kotransporter. NaPi 2a u svakom ciklusu transporta u epitelne ćelije ubacuje katjon Na^+ u višku koji utiče na generisanje membranskog potencijala. NaPi 2a transportuje 3Na^+ i jedan HPO_4^{2-} u istom smeru (Forster i sar., 1999). Kinetika NaPi 2c kotransportera ne utiče na membranski potencijal, nema dodatnog punjenja pozitivnim jonima Na^+ , i transportuju se 2Na^+ i jedan HPO_4^{2-} u epitelne ćelije (Bacconi i sar., 2005). Ghezzi i saradnici (2009) su u svojoj studiji pokazali da NaPi 2c interaguje sa tri jona Na^+ , ali samo dva jona Na^+ se transportuju u citoplazmu epitelnih ćelija. Raspored otpuštanja vezanih jona unutar epitelnih ćelije nije poznat (Biber i sar., 2013).

1.5.1.1. Regulacija ekspresije NaPi 2a kotransportera

Ekspresija NaPi 2a kotransportera je regulisana brojnim humoralnim i metaboličkim faktorima uključujući PTH, FGF23 i Klotho, Pi unet hranom, Vit D i glukokortikoide. Smatra se da nedostatak polnih steroida, naročito estrogena, ima ključnu ulogu u gubitku koštane mase u postmenopauzalnoj osteoporozi (Pacifci, 1996; Weitzmann i Pacifci, 2006). Ipak, efekat polnih steroida na regulaciju reapsorcije Pi u bubrežnim tubulima nije u potpunosti rasvetljen (Faroqui i sar., 2008). Kliničke studije su pokazale da žene koje primaju terapiju estradiolom imaju hipofosfatemiju (Adami i sar., 1992; Castelo-Branco i sar., 1992; Uemura i sar., 2000). U pojedinim studijama uočena je redukcija reapsorcije Pi u proksimalnim tubulima (Uemura i sar., 2000).

Mehanizam delovanja PTH na NaPi 2a kotransporter, kao i prateći signalni mehanizam na ćelijskom nivou detaljno je opisan. Kod miševa i pacova PTH deluje stimulatorno na apikalno i bazolateralno lokalizovan receptor tipa 1 za PTH (PTH1R), i za nekoliko minuta izaziva smanjenje ekspresije NaPi 2a kotransportera na apikalnoj membrani (Picard i sar., 2010). NaPi 2a se brzo povlači sa apikalne membrane endocitozom koja je posredovana klatrinom i degraduje u lizozomima (Bacic i sar., 2006). PTH vezivanjem za svoj receptor PTH1R, aktivira PKA i PKC signalne puteve (Traebert i sar., 2000). Međutim, Nagai i saradnici (2011) u prvi plan ističu aktivaciju signalnog puta cAMP/PKA kao važnijeg u inhibiciji ekspresije NaPi 2a kotransportera posredovane od strane PTH. Aktivacija oba predložena puta rezultuje u fosforilaciji proteina pridruženih NaPi 2a kotransporteru, koji imaju ulogu u održavanju NaPi 2a na apikalnoj membrani (Weinman i sar., 2010). Fosforilacija pridruženih proteina smanjuje jačinu veze sa NaPi 2a i povlačenje sa apikalne ćelijske membrane, što rezultuje povećanjem koncentracije Pi u urinu (Weinman i sar., 2010). Uprkos različitim inicijalnim koracima u signalnim putevima, apikalni i bazolateralni PTH1R aktiviraju iste nishodne efektorne molekule. Pokazano je da inhibitori MAPK signalnog puta delimično ili potpuno poništavaju efekat aktivacije PKA i PKC, što sugerise da PKC i PKA aktiviraju MAPK i ERK 1/2 signalne puteve (Bacic i sar., 2003). U proksimalnim tubulima bubrega potvrđeno je prisustvo CaSR u subapikalnom regionu epitelnih ćelija (Riccardi i sar., 1998) koji pored uloge u detekciji promena koncentracije Ca^{2+} učestvuje u regulaciji ekskrecije Pi posredovane PTH (Ba i sar., 2003). Ekspresija CaSR u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula regulisana je Vit D, PTH i koncentracijom Pi u cirkulaciji (Canaff i sar., 2002; Riccardi i sar., 2000).

Kao i PTH, visoka koncentracija Pi u ishrani uzrokuje smanjenje ekspresije NaPi 2a kotransportera (Levi i sar., 1994; Lotscher i sar., 1997). I ako ovaj proces nije tako detaljno ispitan kao efekat PTH na kotransporter, utvrđeno je takođe da dolazi do endocitoze i degradacije NaPi 2a kotransportera u lizozomima (Keusch i sar., 1998; Pfister i sar., 1998).

Povećana koncentracija Pi u cirkulaciji stimulatorno deluje na sintezu i sekreciju FGF23 (Shimada i sar., 2001), koji ima inhibitoran efekat na reapsorpciju Pi u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega i inhibira aktivnost NaPi 2a kotransportera (Gatteneni i sar., 2009; Razzaque, 2009). Klotho transmembranski protein i FGFR se ekspirira u epitelnim ćelijama distalnih tubula bubrega (Liu i sar., 2008). Takođe, ekspresija Klotho proteina pokazana i u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula, ali u znatno manjem stepenu u odnosu na epitelne ćelije distalnih tubula (Hu i sar., 2010). Interakcija proksimalnih i distalnih tubula, koja omogućava efekat FGF23, preko FGFR-Klotho kompleksa, na regulaciju metabolizma Pi, predstavlja veoma atraktivnu oblast istraživanja (Huang i Moe, 2011). Studija Farrow i saradnika (2009) pokazuje da aplikovanje FGF23 izaziva snažnu aktivaciju ERK1/2 kinaza u epitelnim ćelijama distalnih izuvijanih tubula, samo kada je sa FGFR1 ekspimiran i Klotho receptor. Hu i saradnici (2010) u svojoj studiji pokazuju direktan inhibitoran efekat Klotho proteina na aktivnost NaPi 2a kotransportera, koji se verovatno ostvaruje glukuronidaznom enzimskom aktivnošću solubilnog Klotho proteina.

Efekat Vit D na ekspresiju NaPi 2a kotrasportera nije u potpunosti razjašnjen (Murer i sar., 2000). Vit D ispoljava stimulatoran efekat na ekspresiju NaPi 2a kotransportera, ali nije utvrđeno da li je posredi direktan ili indirektan mehanizam delovanja. Usled inhibitornog delovanja na sintezu i sekreciju PTH, Vit D neposredno

stimulatorno deluje na ekspresiju i aktivnost NaPi 2a kottransportera u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula (Kurnik i Hruska, 1984; 1985). Pošto je koncentracija Vit D u tesnoj vezi sa koncentracijom Ca^{2+} i PTH *in vivo*, teško je razlikovati direktan od indirektnog efekta Vit D na ekspresiju i aktivnost NaPi 2a kottransportera (Murer i sar., 2000). Glukokortikoidi stimulišu ekskreciju Pi inhibitornim delovanjem na NaPi 2a kottransporter, efektom nezavisnim od koncentracije PTH (Biber i sar., 2009).

1.5.2. Reapsorpcija Ca^{2+} u bubregu

Nakon identifikacije CaSR u goveđim paraštitastim žlezdama (Brown i sar., 1993), koji ima esencijalnu ulogu u regulaciji aktivnosti glavnih ćelija, isti istraživački tim je pretpostavio da bi sličan mehanizam koji bi omogućavao detektovanje malih promena u koncentraciji jona Ca^{2+} , mogao postojati i u bubregu. Nekoliko godina kasnije, Riccardi i saradnici (1995) su klonirali CaSR iz bubrega pacova. Ista grupa istraživača (Riccardi i sar., 1996) je svojom naknadnom studijom pokazala da se CaSR u bubregu ne nalazi samo u debelom ushodnom kraku Henleove petlje, kako se do tada smatralo, već i u regionima nefrona za koje se nije znalo da imaju ulogu u metabolizmu jona Ca^{2+} . Naposletku, imunocitohemijskom metodom je utvrđena distribucija CaSR i uočena njegova specifična lokalizacija, u proksimalnim tubulima bubrega i u sabirnim kanalićima receptor je lokalizovan na ćelijskoj membrani epitelnih ćelija okrenutoj ka lumenu tubula-apikalni položaj, dok u debelom ushodnom kraku Henleove petlje receptor ima bazolateralan položaj (Riccardi i sar., 1998).

Različite lokalizacije receptora u određenim delovima nefrona ukazuju na sposobnost CaSR da detektuje promene koncentracije jona ne samo u urinu, nego i u intersticijumu bubrega (Riccardi i Brown, 2010). Istraživanja sprovedena u prethodnoj

deceniji jasno su pokazala da CaSR ima bitnu ulogu u homeostazi divalentnih katjona pošto modulira efekat PTH na tkivo bubrega (Riccardi i Brown, 2010).

Najveći deo reapsorpcije Ca^{2+} odvija se pasivnim transportom u proksimalnim tubulima bubrega i debelom nishodnom kraku Henleove petlje (Mensenkamp i sar., 2006). U distalnom izuvijanom tubulu i u delu tubula koji se nastavlja u sabirni kanalić, reapsorbuje se oko 15% Ca^{2+} u odnosu na ukupnu reapsorpciju u celom bubregu kroz epitelne ćelije distalnih tubula (Hoenderop i sar., 2002; 2005). Reapsorpcija Ca^{2+} je aktivan transćelijski proces koji je regulisan PTH i Vit D. Tako, joni Ca^{2+} ulaze na apikalnoj strani ćelija preko epitelnog Ca^{2+} kanala TRPV5 (od eng. Transient Receptor Potential Vanilloid member 5) i vežu se za kalbindin D28K, koji ih transportuje kroz ćeliju do bazolateralne strane epitelnih ćelija distalnih tubula (Hoenderop, 2005). Joni Ca^{2+} napuštaju ćeliju preko $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjivača tip 1 (NCX1) i Ca^{2+} zavisne ATPaze na ćelijskoj membrani označene kao PMCA1b. Van Abel i saradnici (2005) su pokazali da PTH deluje stimulatorno na ekspresije gena uključenih u transćelijski transport jona Ca^{2+} , što za posledicu ima smanjenje koncentracije Ca^{2+} u urinu. Takođe, Vit D i estrogini deluju stimulatorno na ekspresiju TRPV5 (Prince, 1995; Hoenderop i sar., 2001; Van Abel i sar., 2002). Postranskripcione modifikacije menjaju aktivnost TRPV5 tako što izazivaju konformacione promene proteina i transport TRPV5 do apikalne membrane epitelnih ćelija distalnih tubula, što izaziva smanjenje reapsorpcije jona Ca^{2+} iz lumena distalnih tubula bubrega (Van de Graaf i sar., 2003; 2006).

Transmembranski receptor Klotho pod dejstvom proteolitičkih enzima ADAM10 i 17 može odvojiti vanćelijski domen koji se otpušta u cirkulaciju i predstavlja sekretovanu formu (Imura i sar., 2004; Kurosu i sar., 2005). Chang i saradnici (2005) u svojoj studiji pokazali su da sekretovani Klotho protein ostvaruje glukuronidaznu

aktivnost, i u distalnim tubulima hidrolizuje vanćelijske šećerne ostatke na TRPV5, što stimulatorno utiče na aktivnost TRPV5 i povećava reapsorpciju jona Ca^{2+} u bubregu. Pokazano je da Klotho ne ispoljava glukuronidaznu aktivnost na neglikozilovanu mutiranu formu TRPV5 (Mensenkamp i sar., 2006). Takođe, Cha i saradnici (2008) su pokazali da je zadržavanje TRPV5 transmembranskog proteina na ćelijskoj membrani posledica uklanjanja sijalinske kiseline sa TRPV5, što omogućava vezivanje galektina-1 za TRPV5 i povećanje aktivnosti ovog kanala za Ca^{2+} . Imura i saradnici (2007) su pokazali da vezivanje Klotho proteina za $\alpha 1$ subjedinicu Na-K-ATPazne pumpe povećava aktivnost pumpe i stimuliše izbacivanje Ca^{2+} iz epitelnih ćelija distalnih tubula preko NCX1.

Tokom starenja gubljenje Ca^{2+} dominira u odnosu na njegovo unošenje (Arnaud i Sanchez, 1990). Pošto je nedostatak Klotho proteina povezan sa simptomima sličnim starenju, moguće da je kod starih osoba usled smanjene ekspresije Klotho proteina smanjena i aktivnost TRPV5, a kao posledica toga i reapsorpcija Ca^{2+} (Mensenkamp i sar., 2006).

2. Ciljevi istraživanja

Primena steroidnih hormona, vitamina D i kalcijuma široko je zastupljena u humanoj medicini u prevenciji i tretmanu menopauzalnih i andropauzalnih simptoma. Međutim, upotreba steroidnih hormona sa sobom nosi izvesni rizik za razvoj tumora koji su povezani sa ovom vrstom terapije. U poslednje vreme veliku pažnju privlače izoflavoni soje, poput genisteina i daidzeina, zbog svog blagotvornog dejstva na simptome starenja kod oba pola i antiproliferativnog efekta na hormon zavisne kancere. Međutim, uticaj izoflavona na ključne regulatore homeostaze kalcijuma i fosfora u organizmu još nije istražen.

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se histološkom, ultrastrukturnom, stereološkim, imunohistohemijskim, molekularno-biološkim i biohemijskim metoda ispituju paraštitaste žlezde sa svojim sekretornim ćelijama i epitelne ćelije bubrežnih tubula kao ključni regulatori homeostaze kalcijuma i fosfora u uslovima nedostatka polnih hormona izazvanog orhidektomijom i u uslovima naknadnog hroničnog tretiranja steroidima, izoflavonima i kalcijumom.

Zadaci ovih istraživanja bili su sledeći:

- da se histološki analiziraju poprečni preseki paraštitastih žlezda pacova srednjeg životnog doba u uslovima nedostatka polnih hormona izazvanog orhidektomijom kao i u uslovima naknadnog hroničnog tretiranja steroidima, izoflavonima i kalcijumom i dobijeni rezultati uporede sa histološkim karakteristikama paraštitastih žlezda kontrolnih životinja;
- da se ultrastrukturno analiziraju glavne ćelije paraštitastih žlezda pacova kod svih eksperimentalnih grupa i dobijeni rezultati uporede sa ultrastrukturnim karakteristikama glavnih ćelija paraštitastih žlezda kontrolnih životinja;

- da se stereološki kvantifikuju histomorfološki parametri paraštitastih žlezda (volumen žlezde i volumenske gustine glavnih ćelija i intersticijuma) pacova kod svih eksperimentalnih grupa i dobijene vrednosti uporede sa vrednostima istih parametara kontrolnih životinja;
- da se imunohistohemijski obeleže specifični funkcionalni proteini u epitelnim ćelijama bubrežnih tubula i uporede razlike u jačini imunofluorescentnog signala za NaPi 2a kotransporter i PTH1 receptor, odnosno jačini imunoreaktivnosti za FGF i Klotho receptore u bubrezima pacova kod svih eksperimentalnih grupa u poređenju sa jačinom određenog imunohistohemijskog signala u epitelnim ćelijama bubrega kontrolnih životinja;
- da se metodom RT-PCR analizira i kvantifikuje relativna ekspresija gena za NaPi 2a kotransporter, FGF i Klotho receptore kod svih eksperimentalnih grupa i dobijeni rezultati uporede sa vrednostima ekspresije gena odgovarajućeg specifičnog proteina kod kontrolnih životinja;
- da se biohemijskim analizama kvantifikuju koncentracije PTH, Ca^{2+} , Pi i kreatinina u serumu, kao i koncentracije Ca^{2+} , Pi i kreatinina u urinu pacova svih eksperimentalnih grupa i dobijeni rezultati uporede sa odgovarajućim koncentracijama u serumu i urinu kontrolnih životinja.

3. Materijal i metode

3.1. Eksperimentalne životinje

U istraživanju su korišćeni mužjaci pacova Wistar soja, starosti 16 meseci na kraju eksperimenta (animalni model andropauze), odgajani u vivarijumu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. Upotrebu životinja i eksperimentalni protokol za izradu ove doktorske disertacije odobrio je Etički komitet IBISS-a. Laboratorijski uslovi su ispunjavali standardne zahteve: životinje su boravile u plastičnim kavezima sa prostirkom od sterilne strugotine, pri konstantnoj temperaturi od 20-22°C i pri režimu osvetljenja 12 sati svetla, 12 sati mraka, čime je omogućen dnevno-noćni ritam. Tokom izvođenja eksperimenta životinjama su bile slobodno dostupne voda i laboratorijska hrana, koja nije sadržala sastojke soje ni leguminoza, sa kazeinom kao izvorom proteina (Tabela 1; Picherit i sar. 2000). Komponente hrane su mešane na Katedri za ishranu, Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu.

Tabela 1. Sastav hrane korišćene u eksperimentalnom modelu.

Sastojci	%
Proteini	20.3
Kazein (Alfa Aesar, Johnson Matthey GmbH & Co.KG, Germany)	
Ugljeni hidrati	65
Kukuruzno brašno (Corn Product, Srbija)	
Celuloza	3.2
Cellulose, microcrystalline (Alfa Aesar, Johnson Matthey GmbH & Co.KG, Germany)	
Masti	5.2
Suncokretovo ulje (Vital, Srbija)	
Vitaminska mešavina	1.5
(INSHRA PKB, Srbija)	
Mineralna mešavina (di-Ca-fosfat, kreda, NaCl)	4.8
(INSHRA PKB, Srbija)	

3.2. Eksperimentalne grupe

Mušjaci pacova Wistar soja, stari 15 meseci, su podeljeni u eksperimentalne grupe po osam životinja u svakoj grupi. Pacovi su lažno (sham) operisani (SO) ili orhidektomisani (Orx) pod ketaminskom anestezijom (15 mg/kg telesne mase – t.m., ketamin hidrohlorid, Richter pharma, Austria). Nakon dvonedeljnog oporavka, usledio je hroničan tretman u trajanju od tri nedelje. Svaka tretirana grupa imala je svoje kontrolne SO i Orx grupe za poređenje, kojima je aplikovan odgovarajući volumen adekvatnog rastvarača. Specifikacija grupa korišćenih u eksperimentu prikazana je u Tabeli 2.

Tabela 2. Eksperimentalne grupe.

Naziv grupe	Tretman	Način aplikacije
SO ^a	Sterilno maslinovo ulje	s.c.
Orx ^a	Sterilno maslinovo ulje	s.c.
SO ^b	Sterilno maslinovo ulje+apsolutni etanol (odnos 9:1)	s.c.
Orx ^b	Sterilno maslinovo ulje+apsolutni etanol (odnos 9:1)	s.c.
SO ^c	Fiziološki rastvor	s.c.
Orx ^c	Fiziološki rastvor	s.c.
Orx+TP TP	5 mg/kg t.m. (testosteron – propionat - TP, ICN Galenika, Srbija)	s.c.
Orx+EDP EDP	0.625 mg/kg t.m. (estradiol-dipropionat - EDP, ICN Galenika, Srbija)	s.c.
Orx+Vit. D Vit D	50 µg/kg t.m. (Vitamine D – Vit. D, Sigma Aldrich, Germany)	s.c.
Orx+G G	30 mg/kg t.m. (Genistein – G, LC Laboratories, MA, USA)	s.c.
Orx+D D	30 mg/kg t.m. (Daidzein – D, LC Laboratories, MA, USA)	s.c.
Orx+Ca Ca	28.55 mg/kg t.m. (Ca, Calcium-Sandoz, Novartis, Switzerland)	i.m.

^a EDP, TP i Vit. D su rastvoreni u sterilnom maslinovom ulju; ^b G i D su rastvioreni u mešavini sterilnog maslinovog ulja i apsolutnog etanola u odnosu 9:1; ^c Ca je inicijalno rastvoren u fiziološkom rastvoru.

Životinje su dekapitovane 24h nakon poslednje aplikovane doze, u uzrastu od 16 meseci. Paraštitaste žlezde su izolovane i fiksirane u Bouen-ovom fiksativu, levi bubrezi su fiksirani u 10% puferizovanom formalinu u trajanju od 48h, dok su desni bubrezi zamznuti u tečnom azotu i čuvani u zamrzivaču na -80°C do korišćenja i izolacije RNK. Nakon fiksacije organi su dehidratisani u seriji etanola rastuće koncentracije (30-100%), prosvetljeni u ksilolu i ukalupljeni u paraplastu (Histowax, Histolab Product AB, Sweden). Paraštitaste žlezde i bubrezi su sečeni na poprečne preseke debljine 3 µm, rotacionim mikrotomom (Leica Microsystems GmbH, Germany). Nakon sušenja preseci su pripremljeni za histološko bojenje ili imunohistohemijsko obeležavanje specifičnih antigena.

3.3. Histološko bojenje paraštitastih žlezda

Osnovno histološko bojenje hematoksilin–eozin (H-E) korišćeno je za vizuelizaciju glavnih ćelija i intersticijuma (vezivno tkivo, krvni sudovi, nervi) paraštitastih žlezda. Ovim bojenjem bazofilne strukture u ćelijama se boje plavo, a acidofilne strukture se boje roze ili crveno. Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidratacije preseka u seriji etanola opadajuće koncentracije (100-96-70%), preseci su bojani hematoksilinom, pa eozinom u trajanju od 5 minuta. Sledeći korak je podrazumevao ispiranje u vodi, zatim dehidrataciju u seriji etanola rastuće koncentracije (96-100%), ksilolu i na kraju montiranje pokrovnog stakla DPX-om (Fluka, Switzerland).

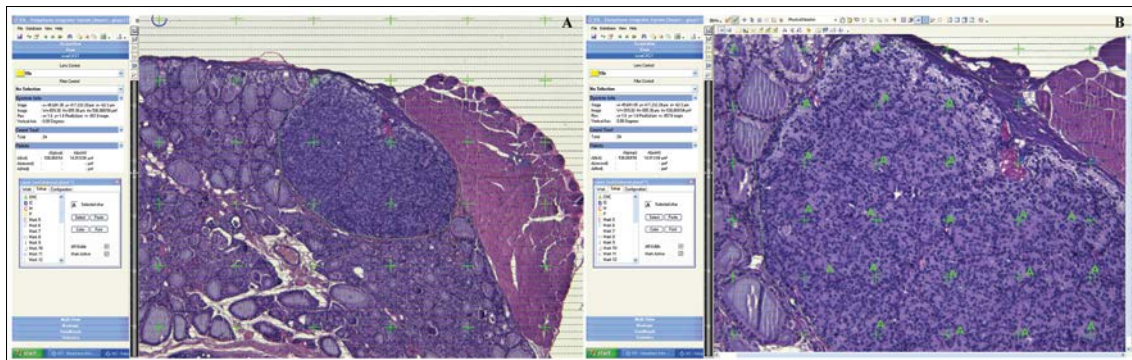
3.4. Stereološka merenja paraštitastih žlezda

Stereološka analiza paraštitastih žlezda je sprovedena uz pomoć newCAST stereološkog softverskog paketa (VIS – Visiopharm Integrator System, version 3.2.7.0. Visiopharm; Denmark). Mikroskop (Olympus BX-51, Olympus Europa GmbH,

Germany) je opremljen sa motorizovanim stočićem (Prior) sa preciznošću pomeranja po x-y osi od 1 μ m. Pomeranje stočića po z osi kontrolisano je mikrokatorom (Heidenhain MT1201) sa preciznošću od 0.2 μ m. Za mikroskop je vezana CCD video kamera (PixeLink). Pri analizi su korišćeni planahromatski objektivni visoke numeričke aperture, uvećanja 4x i 10x. NewCast stereološki sistem je generisao interaktivne stereološke mrežice prilikom analize paraštitastih žlezda.

3.4.1 Volumen paraštitastih žlezda

Volumen paraštitastih žlezda je određen primenom Kavalijerijevog principa (Gundersen, 1986). Analiziran je svaki 30-ti presek paraštitaste žlezde obojen H-E metodom. Presek od kog će otpočeti analiza, izabran je pomoću tablice nasumičnih brojeva. Na monitoru, pri konačnom uvećanju 150x (uveličanje objektivu 4x), definisan je okvir analiziranog tkiva pomoću opcije *Mask* (Slika 1A). Generisana je stereološka mrežica 6x6, a potom su brojani pogodci koji padaju na određenu fazu unutar okvira analiziranog tkiva, na konačnom uvećanju 1500x (uveličanje objektivu 10x; Slika 1B).



Slika 1. A) Definisani okvir (*Mask*) za analizu PT; B) Stereološka mrežica na PT.

Volumen paraštitastih žlezda je izračunat pomoću formule:

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

Gde je $a(p)$ površina koja pripada svakoj tački uzorkovanja tj. jednom pogotku koji pada na analiziranu fazu, \bar{d} je rastojanje između dva uzastopno analizirana preseka, a $\sum Pi$ je suma pogodaka koji padaju na analiziranu fazu. Uslovi pod kojima se meri definišu se tako da broj pogodaka na svaku od analiziranih faza bude između 100 i 200.

3.4.2. Volumenska gustina glavnih ćelija i intersticijuma paraštitastih žlezda

Volumenska gustina glavnih ćelija (V_{vc}) paraštitastih žlezda je izračunata po formuli:

$$\bar{V}_{V_{gc}} = \bar{V}_{gc} \cdot 100 / \bar{V}_{pt}$$

Volumenska gustina intersticijuma (V_{vi}) paraštitastih žlezda je prikazana kao razlika broja 100 i vrednosti volumenske gustine glavnih ćelija (V_{vc}) paraštitastih žlezda:

$$\bar{V}_{Vi} = 100 - \bar{V}_{Vc}$$

3.5. Elektronska mikroskopija

Lobusi štitaste žlezde zajedno sa paraštitastom žlezdom uzeti su nakon dekapitacije i brzo na ledu usitnjeni u kapi 4% glutar-aldehida, napravljenog u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.4), na sitne komadiće. Fiksacija u glutar-aldehidu je trajala 24h, nakon čega su komadići tkiva postfiksirani u osmijum tetraoksidu (OsO_4) u trajanju od 1h. Uzorci su dehidratirani u seriji etanola rastuće koncentracije i ukalupljeni u smeši Araldita i Hardenera. Za sečenje polutankih i ultratankih preseka paraštitastih žlezda

korišćen je LKB ultramikrotom III (tip 8802A, Sweden) sa dijamantskim nožem (Diatome ultra 45°, Diatome, Switzerland). Mrežice sa ultratankim presecima su bojene uranil acetatom i olovo citratom, i posmatrane pod elektronskim mikroskopom MORGAGNI 268 (FEI Company, USA).

3.6. Imunohistohemijsko bojenje specifičnih antigena

Imunohistohemijsko bojenje podrazumeva lokalizaciju određenih proteina u ćeliji na preparatima tkiva, koje se ostvaruje po principu strukturne komplementarnosti, odnosno reakciji specifičnog prepoznavanja i vezivanja antigen-antitelo. Za imunohistohemijsko bojenje korišćene su metoda peroksidaza-antiperoxidaza (PAP, Sternberger, 1970) i imunofluorescentna metoda (IF). Primarna antitela kod primenjenih metoda su neobeležena. Sekundarno antitelo predstavlja most jer se vezuje za primarno antitelo, a sa druge strane je konjugovano sa peroksidazom rena odnosno sa fluorescentnom bojom. Za vizuelizaciju interakcije antigen-antitelo korišćen je hromogenski supstrat 3,3 diaminobenzidin-tetrahlorida (DAB, DAKO A/S, Denmark).

3.6.1. Imunofluorescentno obeležavanje NaPi 2a i PTH1R u tubulima bubrega

Prisustvo natrijum-fosfatnog kotransportera 2a (NaPi 2a) i tipa 1 receptora za PTH (PTH1R) u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega pacova određeno je IF bojenjem. Deparafinisani i rehidratirani preseci bubrega su kuvani u 0.1 M citratnom puferu (pH 6.0) 10 minuta pri snazi mikrotalasne rerne od 750 W, radi demaskiranja antigena, zatim isprani u PBS i tretirani blokirajućim normalnim serumom magarca (Dako, Denmark), rastvorenim u PBS-u (1:10) u trajanju od 1 čas. Nakon blokiranja nespecifičnog bojenja preseci su inkubirani sa anti-pacovskim primarnim antitelima, uzgojenim u zecu, za NaPi 2a (1:100, donacija Dr Jürg Biber, Institut za fiziologiju, Švajcarska) i za PTH1R (1:100, Abcam, UK) preko noći na sobnoj temperaturi. Posle

ispiranja u PBS-u preseci su nakapani sekundarnim anti-pacovskim antitelom, uzgojenim u magarcu, konjugovanim sa Alexa Flour 555 fluorescentnom bojom (1:200, Molecular Probes, Inc., USA) u trajanju od 2 časa. Nakon ispiranja 5 x 5 minuta u PBS-u, montirana su pokrovna stakla Moviol-om 4-88 (Sigma-Aldrich, Co., USA). Rezultati imunofluorescentnog bojenja praćeni su pomoću Carl Zeiss AxioVision mikroskopa (Zeiss, Germany).

3.6.2. Imunohistohemijsko obeležavanje FGFR i Klotho receptora u tubulima bubrega

Prisustvo FGFR i Klotho receptora u epitelinim ćelijama bubrežnih tubula određeno je imunocitohemijskom PAP metodom. Preseci bubrega su deparafinisani i rehidratirani a zatim kuvani u 0.1M citratnom puferu pH 6.0 u trajanju od 10 minuta u mikrotalasnoj rerni pri snazi od 750 W, radi demaskiranja antigena. Nakon blokiranja endogene peroksidaze, radi izbegavanja pozadinskog bojenja, preseci su inkubirani sa normalnim svinjskim serumom (Normal swine serum, Dako Dakopatts, Denmark) razblaženim u fosfatnom puferu (Phosphate Buffer Saline, PBS) u odnosu 1:10 u trajanju od 1h. Zatim su isprani u PBS-u i inkubirani sa anti-pacovskim primarnim antitelima, uzgojenim u zecu, za FGFR (1:100, Abcam, UK) i za Klotho receptor (1:100, Abcam, UK) preko noći na sobnoj temperaturi. Preseci su isprani u PBS-u i inkubirani sa sekundarnim antitelom (svinjski-anti-zečiji IgG; Dakopatts, Danska) razblaženim u PBS-u 1:500, u trajanju od 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u PBS-u, vizuelizacija je obavljena pomoću hromogenskog supstrata DAB-om (DAKO A/S, Denmark). Kontrastiranje je obavljeno Mayer-ovim hematoksilinom (Merck-Alkaloid, Alkaloid, BJRM), dehidratacija serijom etanola rastuće koncentracije, a montiranje DPX-om (Mountant for Histology, Sigma-Aldrich USA).

Specifičnost antitela je potvrđena izostavljanjem primarnog antitela tokom imunohistohemijske procedure, što je rezultiralo izostankom imunoreakcije.

3.7. Analiza ekspresije gena

3.7.1. Priprema uzoraka bubrega za izolaciju totalne RNK

Desni bubrezi su odmrznuti i od svakog je odmereno 100 mg korteksa i homogenizovano u 1 ml TRizol-a (Life Technologies, USA). Nakon homogenizacije tkivo je inkubirano na ledu 5 minuta u cilju što bolje disocijacije nukleoproteinskog kompleksa, a zatim je u ependorfe dodato 0.2 ml hloroforma i inkubirano na ledu u trajanju od 3 min. Nakon centrifugiranja na 12000 g u trajanju od 20 minuta na 4°C u ependorfama su se jasno izdvojila tri sloja: gornja vodena faza u kojoj se nalazila RNK, središnja faza sa proteinima i lipidima, i donja faza u kojoj je DNK. Gornji, vodeni sloj je pipetiran u sterilne konusne ependorfe. RNK je precipitirana dodavanjem 500 µl izopropil-alkohola po uzorku, nakon čega su ependorfe vorteksovane i inkubirane na ledu 10 minuta. Zatim su ependorfe centrifugirane 20 minuta na 12000 g na 4°C. RNK je istaložena na dnu, a supernatanti su pipetirani. Slabo vidljiv talog RNK je zatim ispiran dodavanjem 1 ml 75 % etanola, resuspendovan i centrifugiran dva puta u trajanju po 5 minuta na 7500 g na 4°C. Potom je odliven etanol, a talog RNK je sušen 5 do 10 minuta na sobnoj temperaturi do potpunog isparavanja etanola. Uzorci RNK su finalno rastvoreni u 50 µl dietilpirokarbonat (DEPC) vode.

3.7.2. Reakcija reverzne transkripcije

Nakon izolacije RNK molekuli su prevedeni u komplementarnu DNK (cDNK) reakcijom reverzne transkripcije (RT). Za prevođenje RNK u cDNK korišćen je kit cDNK (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, USA) koji se sastoji od: nasumičnih heksamernih prajmera, 100 mM rastvora sva četiri

dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, po 2 mM ATP, TTP, GTP i CTP), pufera za reverznu transkripciju, enzima reverzne transkriptaze i inhibitora RNaze. Za reakciju prevođenja RNK u cDNK pravljen je originalna mešavina koja se sastoji od 10 µl uzorka (3 µg RNK rastvorene u DEPC vodi), 2 µl pufera za reverznu transkripciju, 0.8 µl 100 mM rastvora sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata, 2 µl nasumičnih prajmera, 1 µl enzima reverzne transkriptaze, 1 µl inhibitora RNaze i 3.2 µl DEPC vode. Uzorci su inkubirani na 25°C u trajanju od 10 minuta a zatim na 37°C, temperaturi optimalnoj za funkcionisanje reverzne transkriptaze, u trajanju od 120 minuta. Reakcija je prekidana inkubacijom uzorka 5 minuta na 85°C, temperaturi na kojoj dolazi do inaktivacije enzima reverzne transkriptaze i razdvajanja sintetisanih lanaca cDNK. Uzorci cDNK su čuvani na -20°C do dalje upotrebe.

3.7.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu („Real-time“ PCR) je metoda koja pored umnožavanja proizvoda omogućava njegovu kvantifikaciju i koristi se za analizu relativne ekspresije gena. U eksperimentima je korišćena mikroploča sa 96 bunarčića, prilagođena za kvantitativni PCR (MicroAmpTM Optical, Applied Biosystems, CA, USA), u svaki od bunarčića je dodavano po 5 µl reakcione smeše SYBR Green PCR Master Mix, koji sadrži potrebnu fluorescentnu boju SYBR Green, enzim AmliTaq Gold koji je DNK polimeraza i dNTP, i po 0.5 µl specifičnih prajmera (finalna koncentracija prajmera je 500 nM) za gen od interesa ili za referentni gen ciklofilin A. Korišćeni parovi prajmera prikazani su u Tabeli 3. Potom je u svaki bunarčića dodavano po 4 µl odgovarajućeg uzorka cDNK. Svi uzorci su rađeni u triplikatima. Bunarčići su zapečaćeni optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, CA, USA), ploča je centrifugirana 2 minuta na 1200 g, preneti u termoblok

aparata za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000, Applied Biosystems, CA, USA). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 1 minut na 95°C u cilju denaturacije lanaca, a zatim 60 ciklusa koji su obuhvatali 15 sekundi na 95°C za početnu denaturaciju lanaca i 1 minut na 60°C za vezivanje prajmera i elongaciju lanaca. Po završenom umnožavanju se postepeno snižava temperatura termo bloka, uz praćenje smanjenja intenziteta fluorescence, koje odgovara disocijaciji nastalog proizvoda. Ovaj korak obezbeđuje proveru kontaminacija uzoraka genomskom DNK kao i eventualnog nastanka tzv. dimer prajmera. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski program (7500 System software; Applied Biosystems, CA, USA) za kvantitativni PCR. Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za ciklofilin A detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} , gde je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i ciklofilina A kao referentnog gena.

Tabela 3. Parovi prajmera korišćeni u „Real-time“ PCR

Gen	Parovi prajmera	Pristupni broj u bazi podataka
NaPi 2a	5'-GCCACTTCTTCTTCAACATC-3' 5'-CACACGAGGAGGTAGAGG-3'	NM_013030.1
Klotho	5'- GAAAATGGCTGGTTTGTCTCG -3' 5'- CCTGATGGCTTTTAAGCTTTC -3'	NM_024146.1
FGFR 1	5'- ATACCACCGACAAGGAAATG -3' 5'- TTCCAGGTACAGAGGTGAGG -3'	NM_024146.1
ER beta	5'-ACAAGGGCATGGAACATCTGCT-3' 5'-TCCGCCTCAGGCCTGGCCATCA-3'	NM_009810
Cyclo A	5'-CAAAGTTCCAAAGACAGCAGAAAA-3' 5'-CCACCCTGGCACATGAAT-3'	NM_017101.1

3.8. Biohemijske analize

Nakon dekapitacije prikupljani su uzorci krvi pojedinačnih životinja u staklene epruvete, koji su ostavljani na sobnoj temperaturi da koagulišu. Nakon koagulacije izdvojeni serum je centrifugiran na 3000 obrtaja u trajanju od 2 x 15 min. Prečišćeni

serum je izdvajan u mikro epruvete i čuvan na -70°C . Pojedinačni uzorci urina, uzeti pre dekapitacije, skladišteni su na temperaturi -70°C .

3.8.1. Određivanje koncentracije parathormona hormona (PTH)

Koncentracija PTH je određivana pomoću „sendvič” ELISA testa (Rat Intact PTH ELISA Kit, Immunotopics, CA, USA). Uzorak seruma nepoznate koncentracije PTH se inkubira sa anti-PTH poliklonskim antitelima. Za C-terminus i središnji deo PTH vezuje se biotinizirano anti-PTH poliklonsko antitelo, pa se zatim ispere višak nevezanog materijala iz uzorka. Za N-terminus PTH vezuje se anti-PTH poliklonsko antitelo konjugovano sa peroksidazom rena, te se ponovo ispira nevezani materijal. U uzorku se nalazi PTH u sendviču između dva poliklonska antitela. Inkubiranje uzorka sa 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidinom omogućava kvantifikovanje vezanog antitelo-enzim kompleksa. Enzimska aktivnost određena je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 450 nm. Zapaženo povećanje apsorbance je direktno proporcionalno koncentraciji PTH u uzorku, a konstrukcijom standardne krive i upoređivanjem vrednosti dobijenih za uzorak očitava se nepoznata koncentracija PTH u serumu. Analitička senzitivnost testa je 1.6 pg/ml, dok varijacija unutar eseja iznosi 2.4% za srednju koncentraciju PTH 54 pg/ml.

3.8.2. Određivanje koncentracije kalcijuma (Ca^{2+}) u serumu i urinu

Analiza koncentracije Ca^{2+} u serumu i urinu određena je kolorimetrijskom metodom, korišćenjem Roche kalcijum reagenasa (Pufer + hromogen; Roche Diagnostics GmbH, Germany) i Roche/Hitachi 912 analizera. Atomski apsorpcijski spektrometar korišćen je za određivanje koncentracije Ca^{2+} pomoću kompleksometrijskog metoda. Uzorku se dodaje R1 (etanolamin pufer), zatim R2 reagens (hromogen: o-cresolftalein kompleks) i dolazi do formiranja Ca^{2+} -o-

cresoftalein kompleksa. Intenzitet obojenosti dobijenog purpurnog kompleksa meri se fotometrijski i direktno je proporcionalan koncentraciji Ca^{2+} u uzorku.

3.8.3. Određivanje koncentracije fosfata (Pi) u serumu i urinu

Koncentracija Pi u serumu i urinu određena je pomoću Roche fosfor reagensa (Reagens rastvarač + fosfatni reagens; Roche Diagnostics GmbH, Germany) i Roche/Hitachi 912 analizera. Uzorku se dodaje R1 (reagens rastvarač: sumporna kiselina; deterdžent), a zatim R2 (fosfatni reagens: amonijum molibdat). Metoda za određivanje neorganskog fosfora zasniva se na reakciji Pi sa amonijum molibdatom usled čega nastaje amonijum fosfomolibdat kompleks u prisustvu sumporne kiseline. Prisustvo kompleksa se utvrđuje fotometrijski u opsegu ultravioletne oblasti spektra (340 nm).

3.8.4. Određivanje koncentracije kreatinina u serumu i urinu

Enzimsko-kolorimetrijska metoda korišćena je za određivanje koncentracije kreatinina u serumu i urinu eksperimentalnih životinja. Oslobađanje vodonik peroksida nakon enzimskih reakcija kreatinina i kreatininaze, kreatina i kreatinaze, sarkozina i sarkozin oksidaze meri se spektrofotometrijski Trinderovom reakcijom. Intenzitet hromogena kvinoneimina direktno je proporcionalan koncentraciji kreatinina u ispitivanom uzorku. Analitička osetljivost testa za uzorke seruma je $5 \mu\text{mol/l}$, dok je za uzorke urina osetljivost 0.1 mmol/l .

3.9. Statistička analiza podataka

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD. Za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata kontrolnih (SO i Orx) i tretiranih grupa korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena *post hoc* Duncan-ovim testom za poređenja između grupa. Vrednost parametra p manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

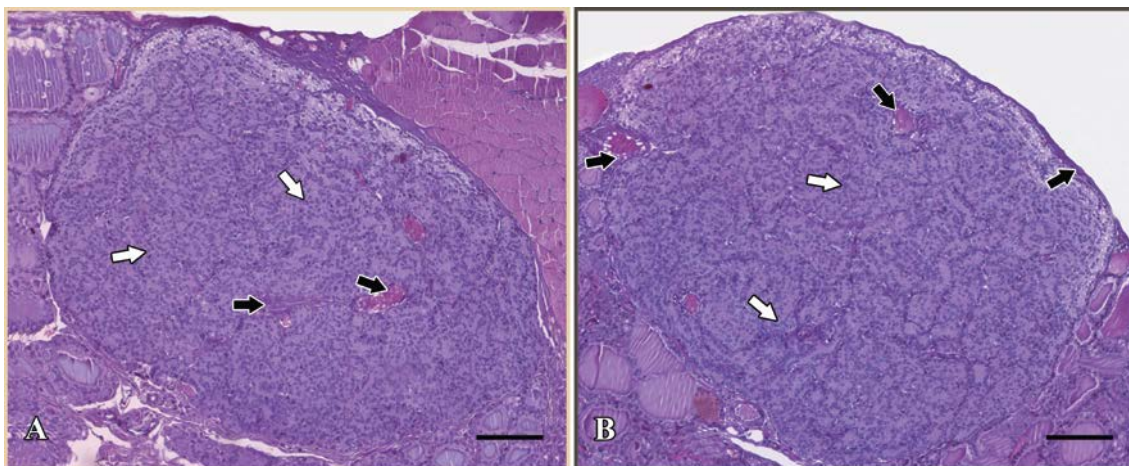
4. Rezultati

4.1. Histološke i stereološke karakteristike paraštitastih žlezda kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

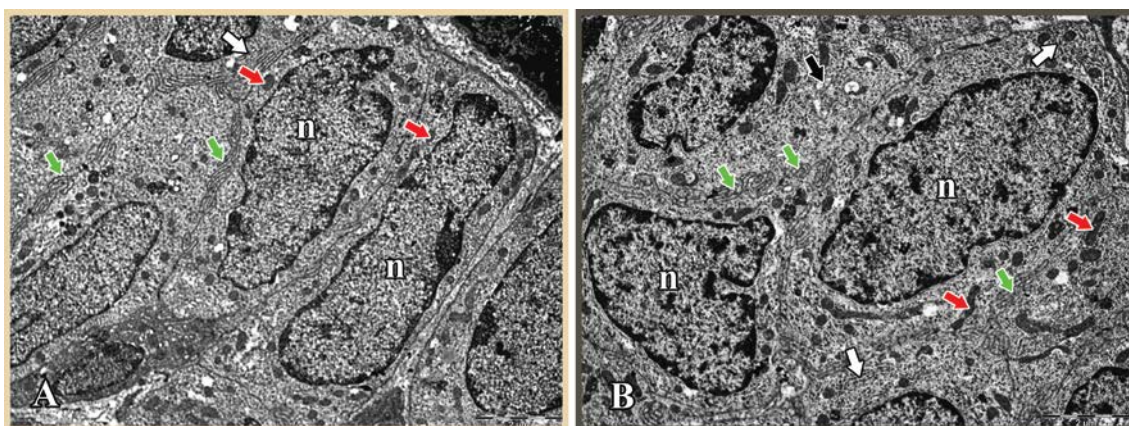
4.1.1. Paraštitaste žlezde lažno operisanih i orhidektomisanih pacova

Paraštitaste žlezde kontrolnih, andropauzalnih mužjaka pacova su smeštene u centralnom delu lobusa štitnjače odvojene su sopstvenom vezivnom kapsulom. Histološka analiza H-E obojenih poprečnih preseka paraštitastih žlezda ukazuje na okrugle ili izdužene žlezde, sa gusto pakovanim glavnim ćelijama, organizovanim u grupe ili trake, oko i duž krvnih kapilara. Kod SO grupe životinja se jasno uočava vezivna kapsula paraštitastih žlezda, kao i delikatne septe vezivnog tkiva i krvni sudovi između glavnih ćelija (Slika 2A). Poprečni preseki paraštitastih žlezda Orx životinja ukazuju na veće žlezde i brojnije glavne ćelije, kao i na uočljiviji intresticijum u poređenju sa SO grupom (Slika 2B). Parametri analize histološke slike paraštitastih žlezda unutar kontrolne SO grupe (SO^a, SO^b i SO^c), kao i unutar Orx grupe (Orx^a, Orx^b i Orx^c) ne pokazuju značajne razlike u pogledu oblika i veličine žlezda u okviru SO odnosno Orx grupe.

Ultratanki preseki glavnih ćelija paraštitastih žlezda SO kontrolne grupe životinja pokazuju gusto pakovane ćelije, organizovane u trake ili grupe, i uvek raspoređene uz i oko krvnih kapilara, sa brojnim interdigitacijama ćelijske membrane (Slika 3A). gER i Goldži aparat su umereno razvijeni, a u citoplazmi se uočavaju mitohondrije i izduženo jedro, lokalizovano bliže apikalnom delu ćelija (Slika 3A). Nakon Orx, kod glavnih ćelija je uočljivo krupno centralno postavljeno jedro, interdigitacije ćelijske membrane su izraženije i brojnije, gER i Goldži aparat su bolje razvijeni, i mitohondrije brojnije u poređenju sa SO kontrolnom grupom životinja (Slika 3B).



Slika 2. Paraštitaste žlezde andropauzalnih mužjaka pacova. A) SO životinje; B) Orx životinje. Bele strelice - glavne ćelije, crne strelice - intersticijum. H-E bojenje. Bar – 80 μm .



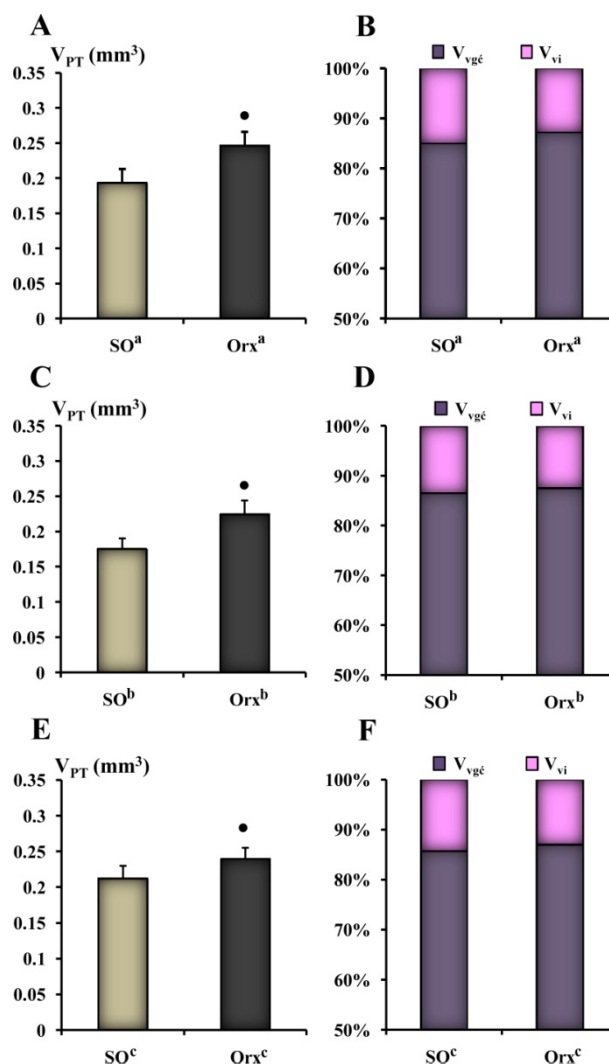
Slika 3. Ultratanki preseki glavnih ćelija paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova. A) SO životinje; B) Orx životinje. Bele strelice - gER, crne strelice - Goldži kompleks, crvene strelice - mitohondrije, zelene strtelice - interdigitacije ćelijske membrane, n - jedro. Bar – 2 μm .

Stereološkom metodom je utvrđeno da je volumen paraštitastih žlezda (V_{PT}) SO^a grupe životinja iznosio $0.19 \pm 0.02 \text{ mm}^3$. Kod Orx^a životinja, vrednost V_{PT} je statistički značajno povećana za 28% ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolnu SO^a vrednost (Histogram 1A). Volumenska gustina glavnih ćelija ($V_{vgć}$) kod SO^a grupe životinja je iznosila $86.46 \pm 4.04\%$. Nakon Orx^a, $V_{vgć}$ je povećana, ali ne statistički značajno u poređenju sa SO^a životinjama. Volumenska gustina intersticijuma (V_{vi}) paraštitastih žlezda kod SO^a

kontrolne grupe je iznosila $15.23 \pm 1.16\%$. Kod Orx^a grupe V_{vi} je smanjena, ali ne statistički značajno u poređenju sa SO^a grupom (Histogram 1B).

Vrednost V_{PT} kod SO^b životinja je iznosila $0.17 \pm 0.02 \text{ mm}^3$. Kod Orx^b životinja V_{PT} je statistički značajno povećan za 28% ($p < 0.05$) u poređenju sa SO^b kontrolnom grupom pacova (Histogram 1C). V_{vgc} SO^b kontrolne grupe je iznosila $86.46 \pm 0.80\%$. Nakon Orx^b V_{vgc} je povećana, ali ne statistički značajno u poređenju sa SO^b životinjama. V_{vi} kod SO^b grupe životinja je iznosila $13.53 \pm 0.80\%$. Kod Orx^b grupe V_{vi} je smanjena, ali ova promena nema statističku značajnost u odnosu na SO^b grupu (Histogram 1D).

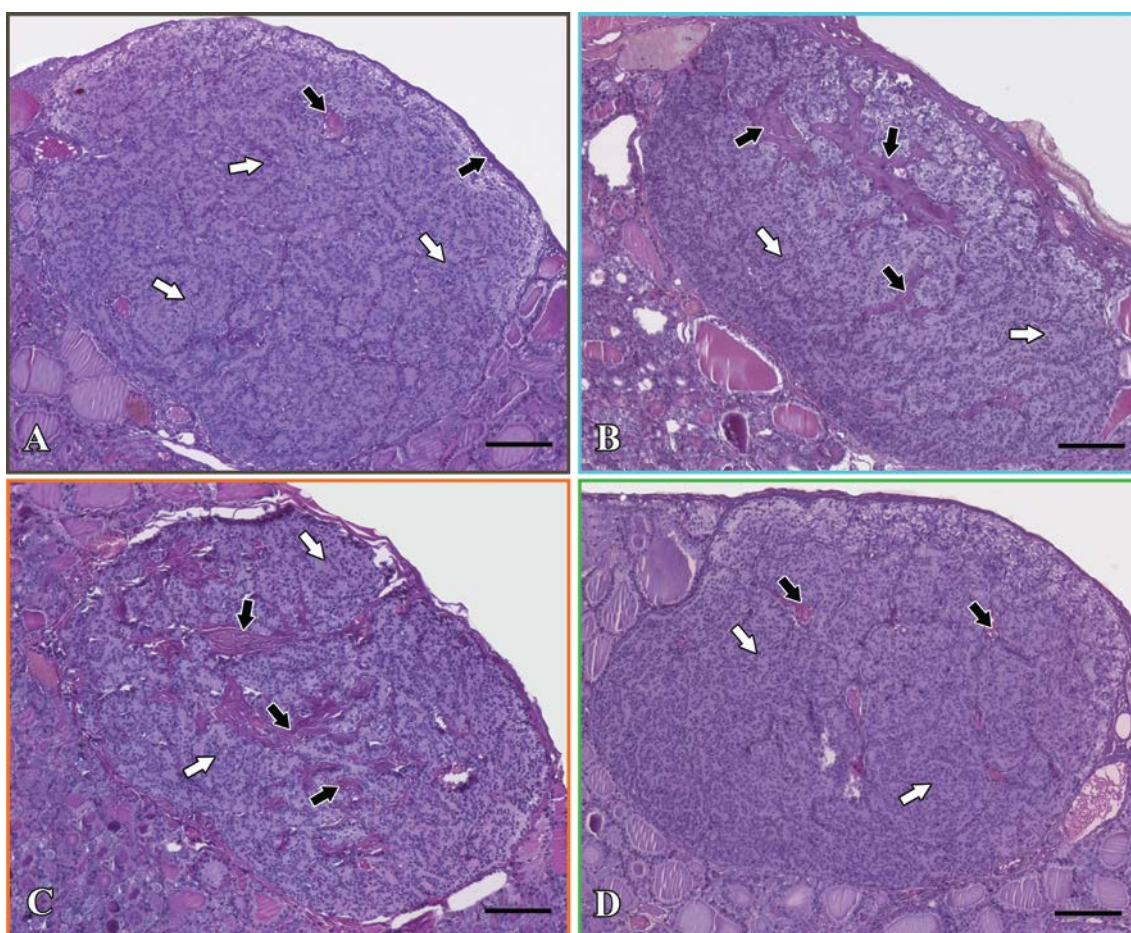
V_{PT} kontrolne SO^c grupe je iznosio $0.21 \pm 0.02 \text{ mm}^3$. Kod Orx^c grupe, V_{PT} je statistički značajno povećan za 13% ($p < 0.05$) u poređenju sa SO^c kontrolnom grupom (Histogram 1E). V_{vgc} kod SO^c grupe je iznosila $85.69 \pm 2.73\%$. Kod Orx^c grupe V_{vgc} je povećana, ali ne statistički značajno u poređenju sa vrednošću istog parametra kod SO^c životinja. V_{vi} kod SO^c životinja je iznosila $14.31 \pm 2.73\%$, a smanjenje V_{vi} kod Orx^c životinja nije statistički značajno u poređenju sa SO^c grupom (Histogram 1F).



Histogram 1. A) Volumen paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova (V_{PT} , mm^3). B) Volumenska gustina glavnih ćelija (V_{vgc} , %) i intersticijuma (V_{vi} , %) paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^a ; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^b ; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^c ; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a ; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b ; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c . Prikazane su srednje vrednosti \pm SD. • $p < 0.05$ u odnosu na SO .

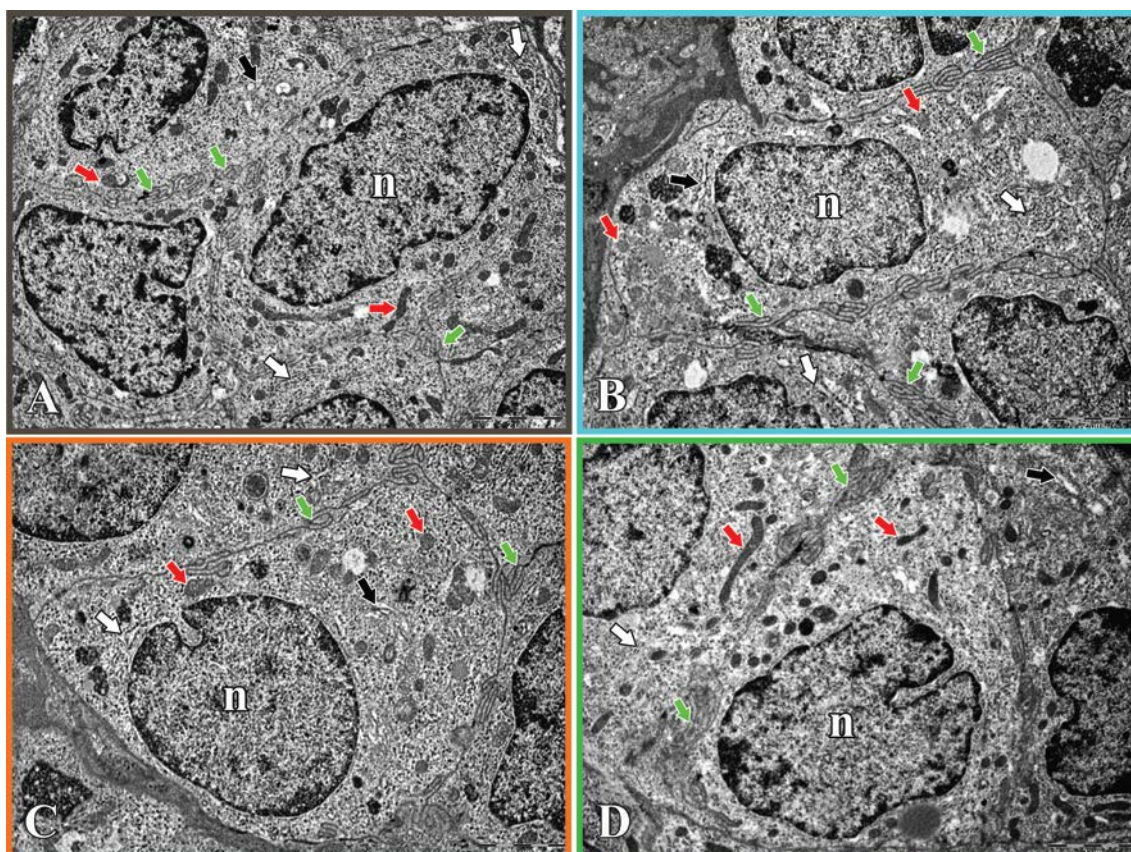
4.1.2. Paraštitaste žlezde orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

Histološka analiza poprečnih preseka paraštitastih žlezda orhidektomisanih mužjaka pacova nakon tretmana TP-om, EDP-om ili Vit D ukazuje na manje žlezde u odnosu na Orx grupu životinja (Slike 4A-D). Kod životinja tretiranih TP-om ili EDP-om, pretežno u centralnom delu paraštitastih žlezda, uočava se izraženiji i masivniji intersticijum od proliferisanog vezivnog tkiva i proširenih krvnih sudova, u poređenju sa paraštitastim žlezdama kod Orx životinja (Slike 4B i 4C).



Slika 4. Paraštitaste žlezde andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane TP-om; C) Orx životinje hronično tretirane EDP-om; D) Orx životinje hronično tretirane Vit D. Bele strelice - glavne ćelije, crne strelice - intersticijum. H-E bojenje. Bar – 80 μ m.

Ultratanki preseci glavnih ćelija paraštitastih žlezda nakon tretmana TP-om, EDP-om ili Vit D pokazuju manje brojne interdigitacije ćelijske membrane, slabije razvijen gER i Goldži aparat, dok se u citoplazmi uočava manji broj mitohondrija u poređenju sa glavnim ćelijama Orx grupe životinja (Slika 5A-D).

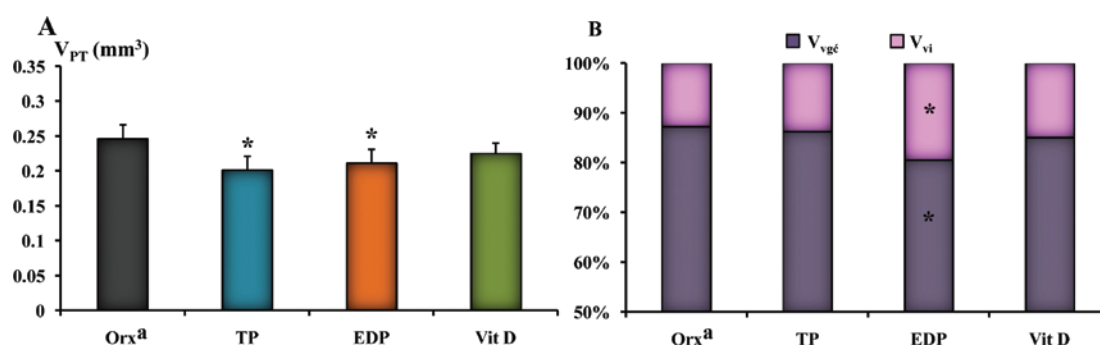


Slika 5. Ultratanki preseci glavnih ćelija paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane TP-om; C) Orx životinje hronično tretirane EDP-om; D) Orx životinje hronično tretirane Vit D. Bele strelice - gER, crne strelice - Goldži kompleks, crvene strelice - mitohondrije, zelene strelice - interdigitacije ćelijske membrane, n - jedro. Bar – 2 μ m.

Stereološka analiza je pokazala da je nakon hroničnog tretmana Orx životinja TP-om V_{PT} statistički značajno smanjen za 18% ($p < 0.05$), a nakon tretmana EDP-om za 14% ($p < 0.05$), u poređenju sa Orx^a grupom životinja. Tretman Vit D je smanjio V_{PT} , ali ova promena nema statističku značajnost u odnosu na Orx^a grupu (Histogram 2A).

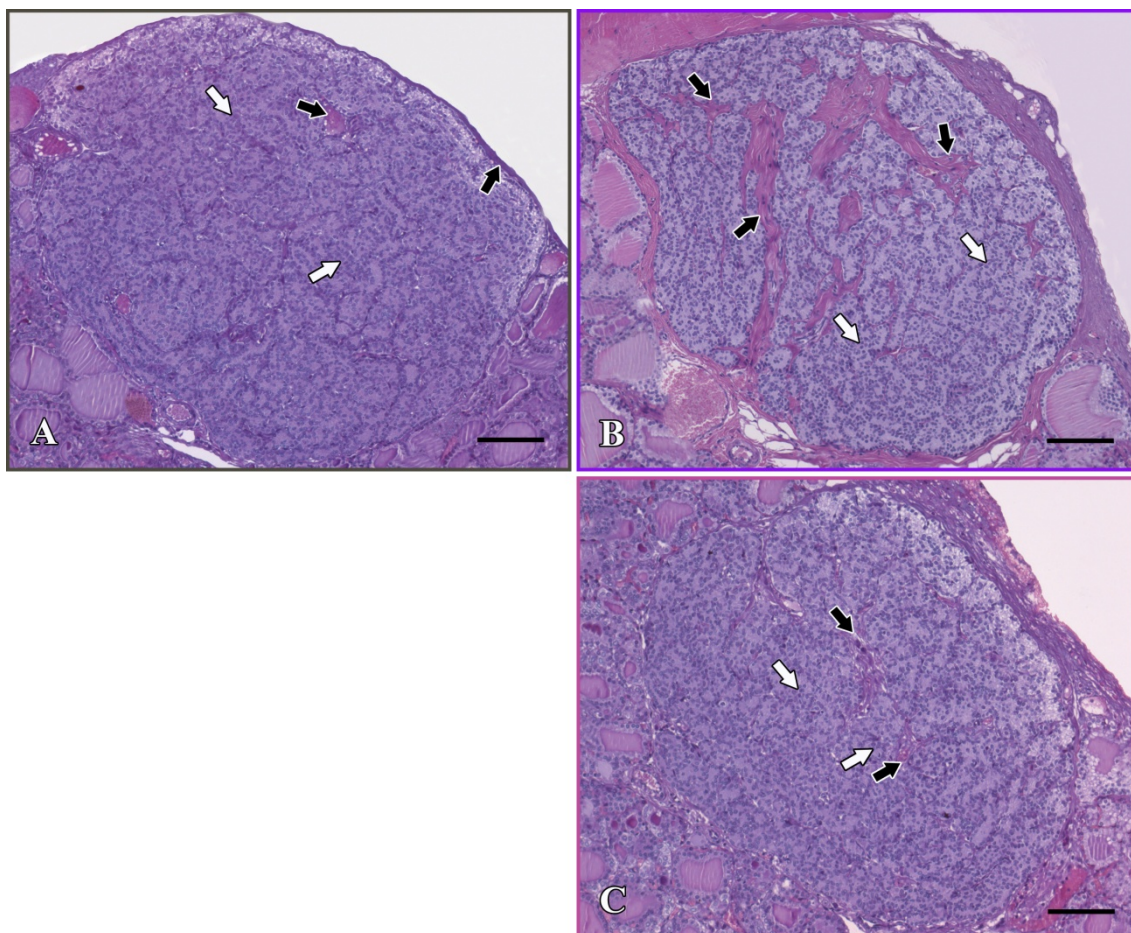
Nakon tretmana TP-om ili Vit D V_{vgc} je smanjena, ali ne statistički značajno u odnosu na istu vrednost kod Orx^a pacova. Tretman Orx životinja EDP-om je statistički značajno smanjio V_{vgc} za 8% ($p < 0.05$) u poređenju sa Orx^a grupom životinja (Histogram 2B).

Tretman EDP-om je statistički značajno povećao V_{vi} za 52% ($p < 0.05$) u poređenju sa istom vrednošću kod Orx životinja. Tretmani TP-om ili Vit D nisu uzrokovali statistički značajne promene V_{vi} u poređenju sa odgovarajućim vrednostima kod Orx^a životinja (Histogram 2B).



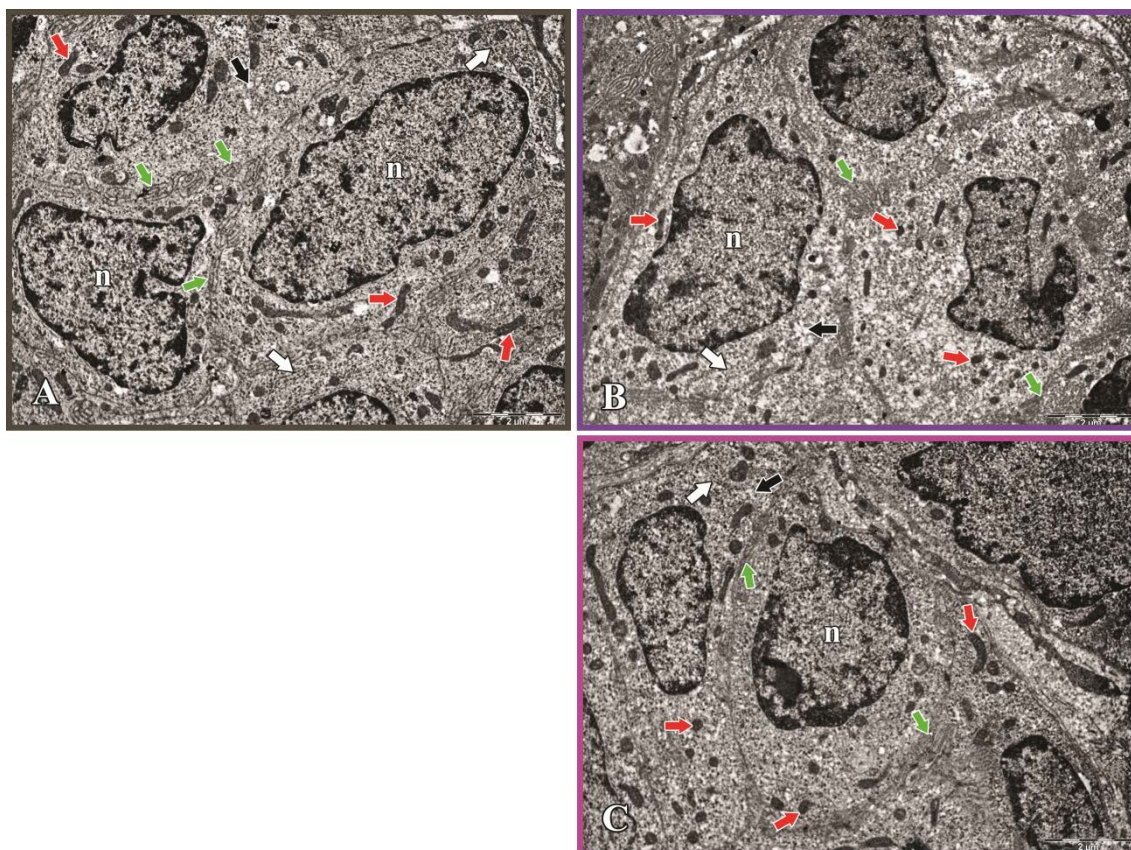
Histogram 2. A) Volumen paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova (V_{PT} , mm^3). B) Volumenska gustina glavnih ćelija (V_{vgc} , %) i intersticijuma (V_{vi} , %) paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova. Orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D. Prikazane su srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na Orx.

Histološka analiza paraštitastih žlezda pacova nakon aplikacije genisteina pokazuje žlezde sa jasno uočljivom vezivnom kapsulom i izuzetno izraženom proliferacijom vezivnog tkiva u odnosu na paraštitaste žlezde Orx životinja (Slika 6B). Nakon tretmana daidzeinom glavne ćelije paraštitastih žlezda su uniformno organizovane sa umerenije izraženim septama vezivnog tkiva, u poređenju sa Orx grupom (Slika 6C).



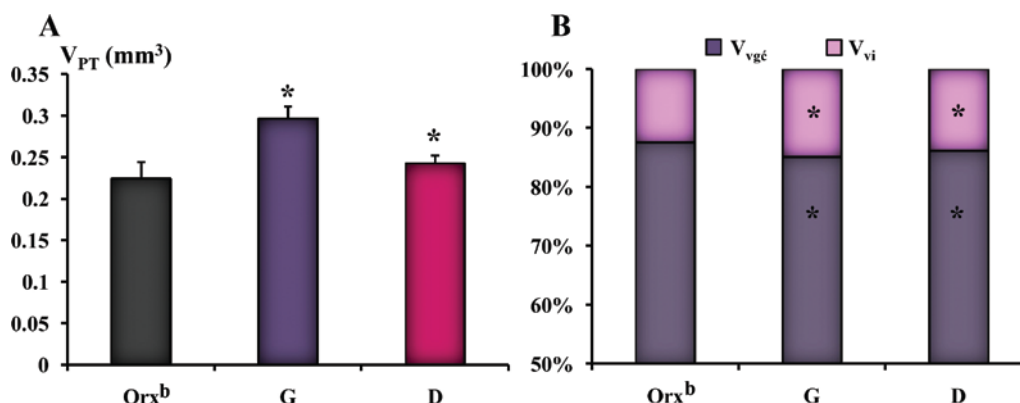
Slika 6. Paraštitaste žlezde andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje, B) Orx životinje hronično tretirane genisteinom; C) Orx životinje hronično tretirane daidzeinom. Bele strelice - glavne ćelije, crne strelice - intersticijum. H-E bojenje. Bar – 80 μ m.

Ultratanki preseki glavnih ćelija paraštitastih žlezda životinja hronično tretiranih izoflavonima genisteinom i daidzeinom pokazuju znatno manje izražene interdigitacije ćelijske membrane, slabije razvijene gER i Goldži kompleks, kao i manji broj sitnijih mitohondrija distribuirane po citoplazmi, u poređenju sa glavnim ćelijama kod Orx grupe životinja (Slika 7A-C).



Slika 7. Ultratanki preseki glavnih ćelija paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane genisteinom; C) Orx životinje hronično tretirane daidzeinom. Bele strelice - gER, crne strelice - Goldži kompleks, crvene strelice - mitohondrije, zelene strelice - interdigitacije ćelijske membrane, n - jedro. Bar – 2 μm .

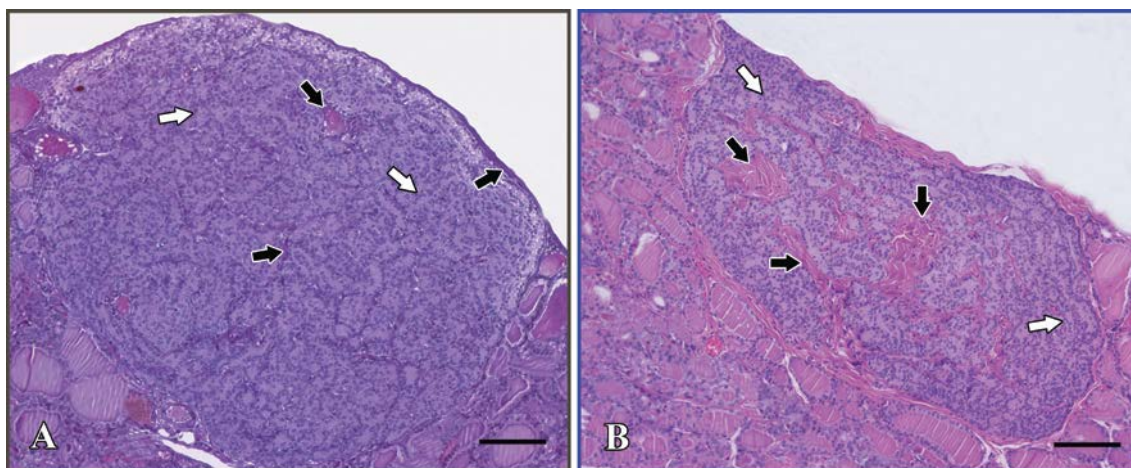
Streološka analiza pokazuje da je hronični tretman pacova genisteinom statistički značajno povećao V_{PT} za 32% ($p < 0.05$) u odnosu na vrednost V_{PT} kod Orx^b životinja. Tretman daidzeinom je statistički značajno smanjio V_{PT} za 8% ($p < 0.05$) u poređenju sa istom vrednošću kod Orx^b pacova (Histogram 3A). Tretmani genisteinom i daidzeinom su statistički značajno smanjili V_{vgc} za 3%, odnosno za 2% ($p < 0.05$) u poređenju sa Orx^b grupom životinja. Nakon tretmana genisteinom V_{vi} je statistički značajno povećana za 20% ($p < 0.05$), dok je tretman daidzeinom statistički značajno povećao V_{vi} za 11% ($p < 0.05$), u odnosu na Orx^b grupu životinja (Histogram 3B).



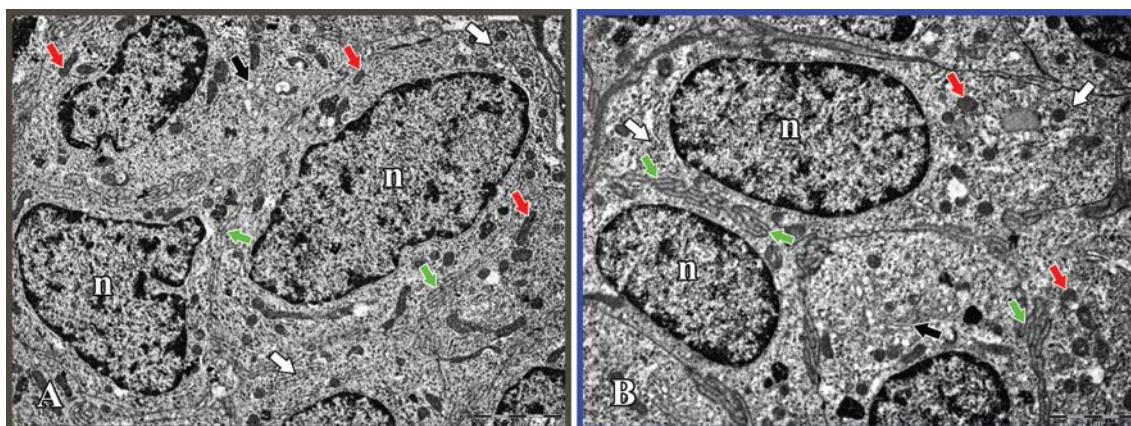
Histogram 3. A) Volumen paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova (V_{PT} , mm³). B) Volumenska gustina glavnih ćelija ($V_{vgć}$, %) i intersticijuma (V_{vi} , %) paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova. Orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b; Orx životinje hronično genisteinom, G, Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D. Prikazane su srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na Orx.

Nakon hroničnog tretmana Orx životinja sa kalcijumom histološka analiza pokazuje sitnije paraštitaste žlezde izduženog oblika, sa izraženom proliferacijom vezivnih septi pretežno u centralnom regionu žlezde u poređenju sa Orx grupom (Slika 8B).

Na ultratankim presecima glavnih ćelija paraštitastih žlezda nakon tretmana kalcijumom uočavaju se manje izražene interdigitacije ćelijske membrane, slabije razvijeni gER i Goldži kompleks, i manji broj mitohondrija u poređenju sa glavnim ćelijama Orx životinja (Slika 9B).

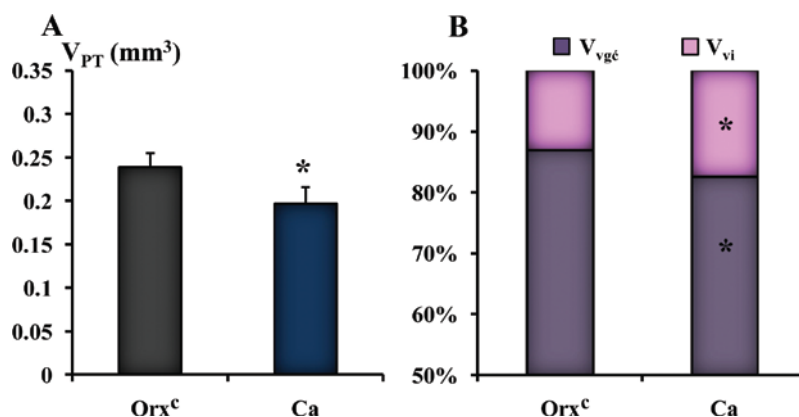


Slika 8. Paraštitaste žlezde andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje, B) Orx životinje hronično tretirane kalcijumom. Bele strelice - glavne ćelije, crne strelice - intersticijum. H-E bojenje. Bar – 80 μm .



Slika 9. Ultratanki preseki glavnih ćelija paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane kalcijumom. Bele strelice - gER, crne strelice - Goldži kompleks, crvene strelice - mitohondrije, zelene strelice - interdigitacije ćelijske membrane, n - jedro. Bar – 2 μm .

Hronični tretman kalcijumom uzrokovao je statistički značajno smanjenje V_{PT} za 18% ($p < 0.05$) u odnosu na Orx^c grupu (Histogram 4A). Nakon ovog tretmana statistički je značajno smanjena V_{vgc} za 4% ($p < 0.05$) i statistički značajno povećana V_{vi} za 35% ($p < 0.05$) u odnosu na vrednost ovih parametara kod Orx^c životinje (Histogram 4B).



Histogram 4. A) Volumen paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova (V_{PT} , mm³). B) Volumenska gustina glavnih ćelija ($V_{vgč}$, %) i intersticijuma (V_{vi} , %) paraštitastih žlezda andropauzalnih mužjaka pacova. Orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na Orx.

4.2. Imunohistohemijske karakteristike i analiza relativne ekspresije gena specifičnih funkcionalnih proteina u bubrezima kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

4.2.1. Imunofluorescentne karakteristike i analiza relativne ekspresije gena za NaPi 2a kotransporter u bubrezima kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

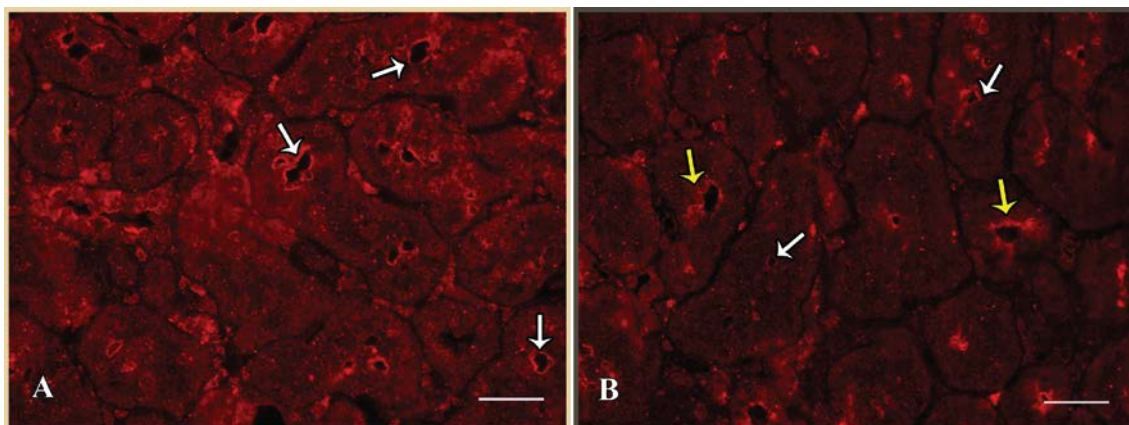
Na poprečnim preseccima bubrega SO životinja se uočava jak imunofluorescentni signal obojenog NaPi 2a kotransportera u oblasti četkaste ivice epitelnih ćelija proksimalnih tubula (Slika 10A). Nakon Orx intenzitet signala za NaPi 2a je smanjen u poređenju sa SO životinjama i uočava se prisustvo obeleženog NaPi 2a kotransportera u subapikalnom domenu epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega (Slika 10B).

Nakon hroničnih tretmana TP-om (Slika 11B) i Vit D (slika 11D), jačina imunofluorescentnog signala za NaPi 2a kotransporter je neznatno pojačana u apikalnom domenu epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega, u poređenju sa Orx

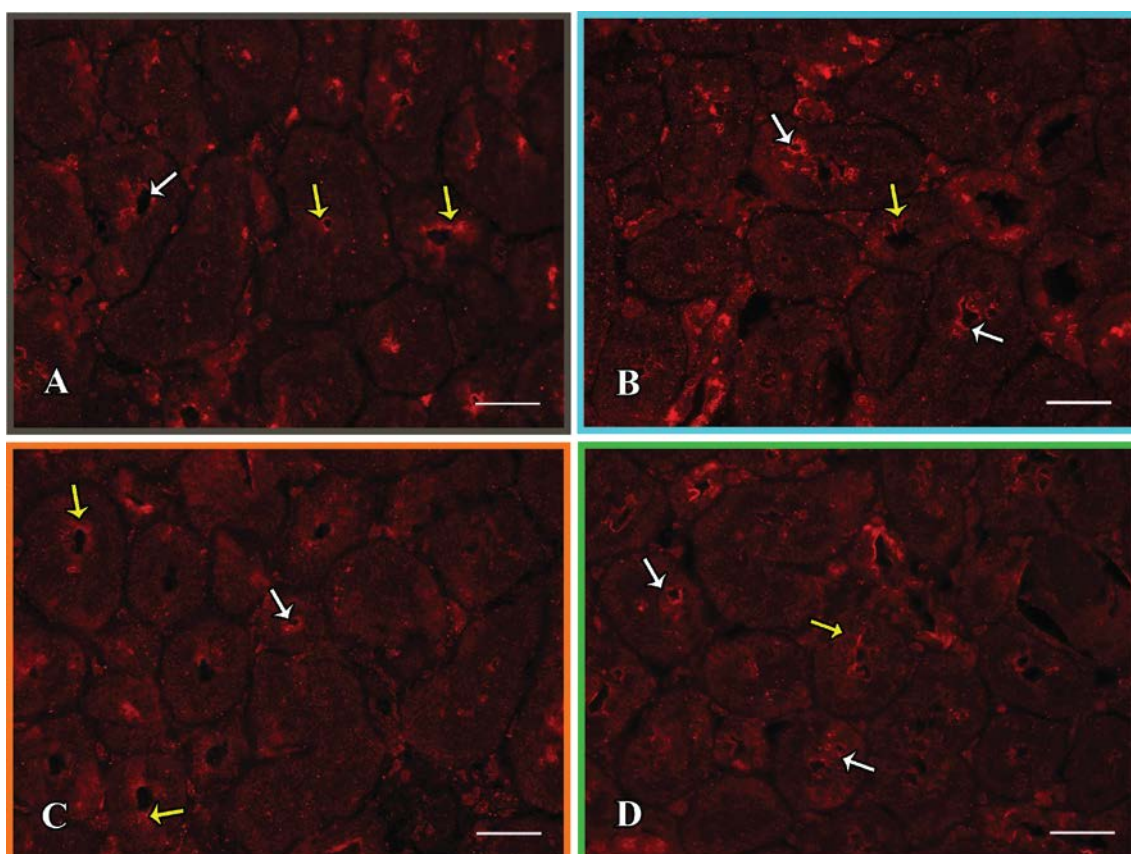
životinjama. Hronični tretman EDP-om je uzrokovao smanjenje intenziteta imunofluorescentnog signala NaPi 2a kotransportera na apikalnom polu epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega, u odnosu na Orx grupu životinja (Slika 11C).

Hronični tretman genisteinom značajno je povećao intenzitet imunofluorescentno obeleženog signala NaPi 2a kotransportera na četkastoj ivici epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega u poređenju sa Orx životinjama (Slika 12B). Nakon hroničnog tretmana daidzeinom uočava se znatno intenzivniji imunofluorescentni signal NaPi 2a kotransportera u apikalnom domenu epitelnih ćelija, u odnosu na Orx grupu (Slika 12C).

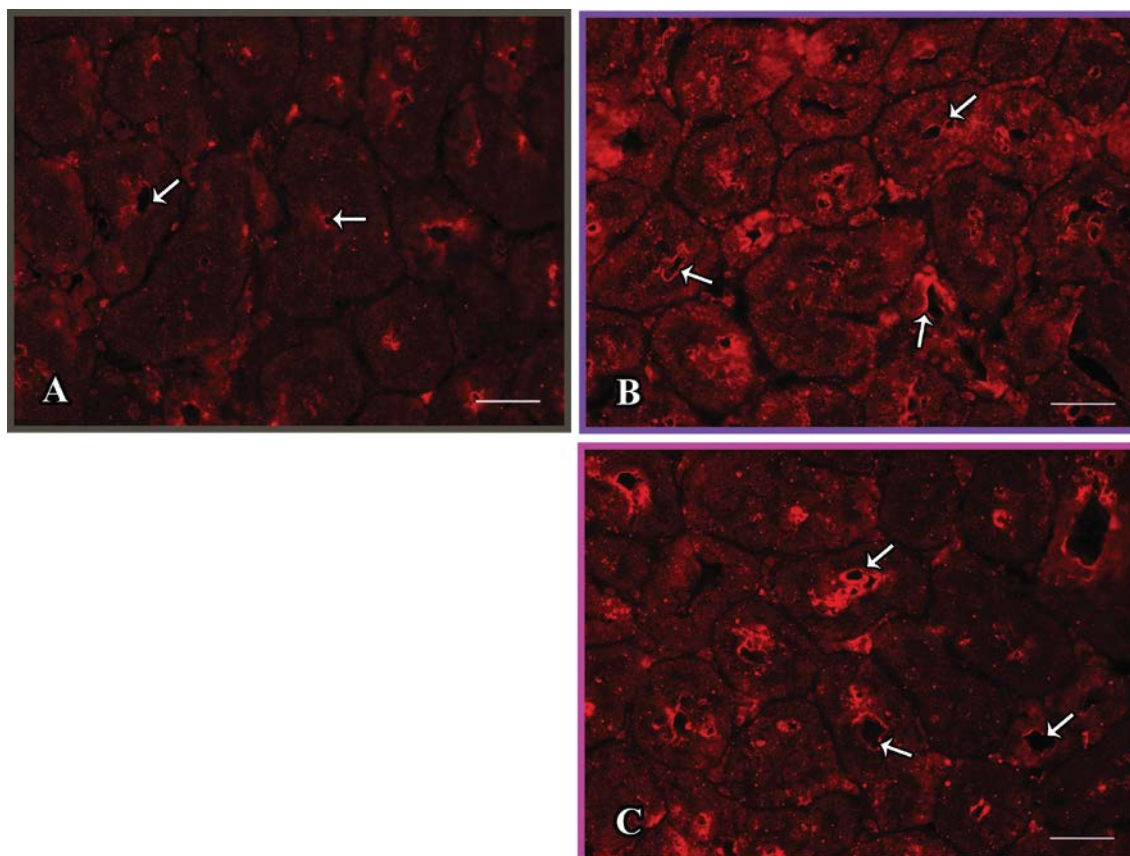
Hronični tretman kalcijumom nije značajno promenio intenzitet signala imunofluorescentno obeleženog NaPi 2a kotransportera u apikalnom domenu epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega, u poređenju sa Orx pacovima (Slika 13B).



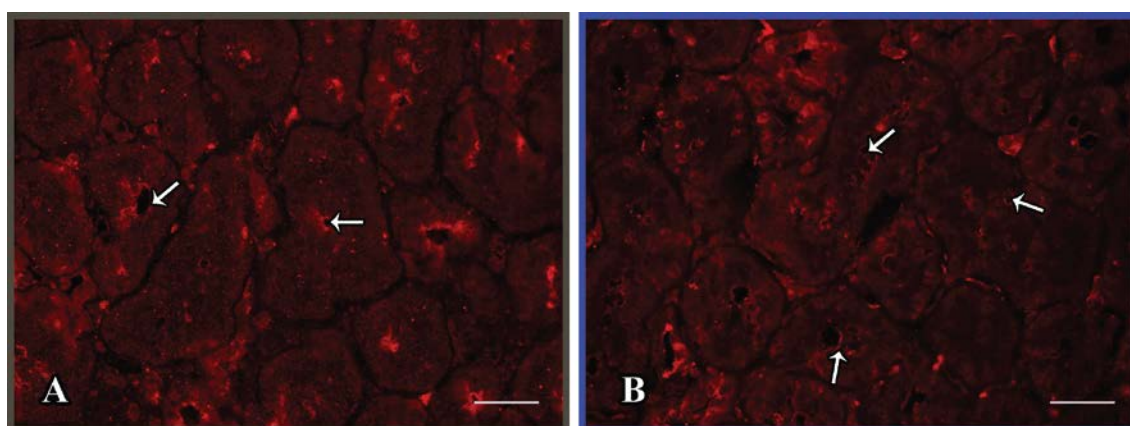
Slika 10. Imunofluorescentno obeležen NaPi 2a kotransporter u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) SO životinje; B) Orx životinje. Bele strelice - apikalno lokalizovan NaPi 2a kotransporter; žute strelice - subapikalno lokalizovan NaPi 2a kotransporter. Bar – 10 μ m.



Slika 11. Imunofluorescentno obeležen NaPi 2a kotransporter u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane TP-om; C) Orx životinje hronično tretirane EDP-om; D) Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D. Bele strelice - apikalno lokalizovan NaPi 2a kotransporter; žute strelice - subapikalno lokalizovan NaPi 2a kotransporter. Bar – 10 μ m.

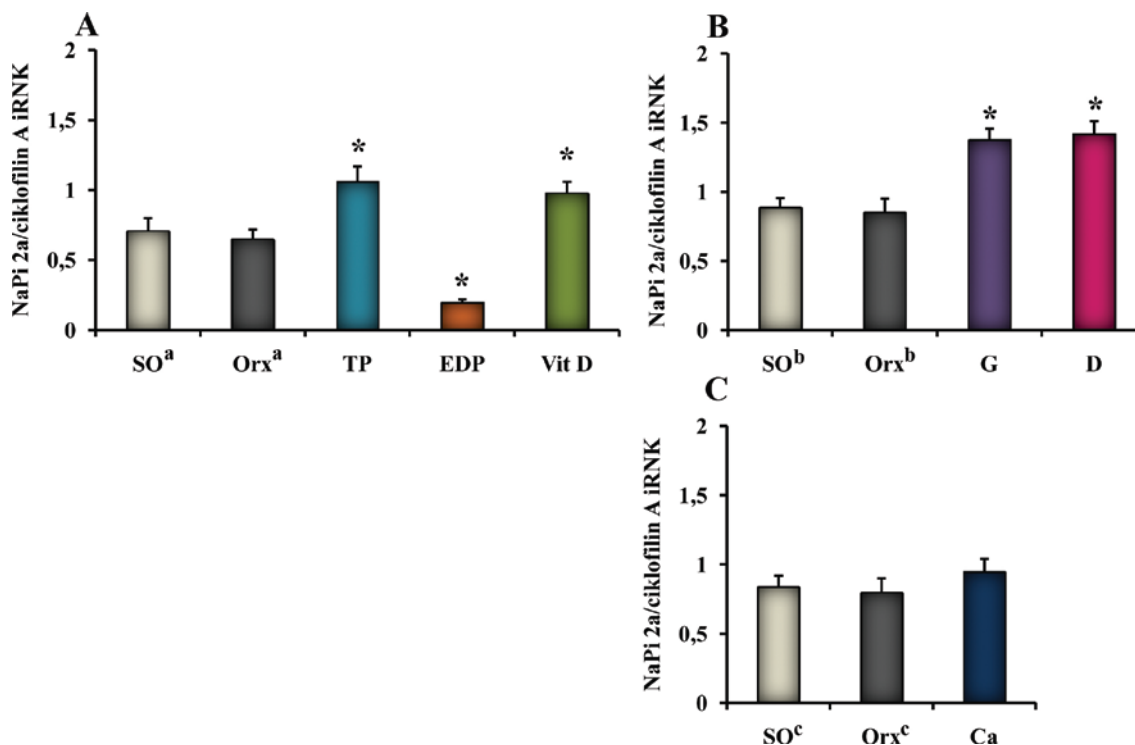


Slika 12. Imunofluorescentno obeležen NaPi 2a kotransporter u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane genisteinom; C) Orx životinje hronično tretirane daidzeinom. Bele strelice - apikalno lokalizovan NaPi 2a kotransporter. Bar – 10 μm .



Slika 13. Imunofluorescentno obeležen NaPi 2a kotransporter u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane kalcijumom. Bele strelice - apikalno lokalizovan NaPi 2a kotransporter. Bar – 10 μm .

Analiza relativne ekspresije gena za NaPi 2a kotransporter u tubulima bubrega andropauzalnih mužjaka pacova pokazuje da je nakon Orx^a nivo iRNK za NaPi 2a neznatno smanjen u poređenju sa SO^a životinjama (Histogram 5A).



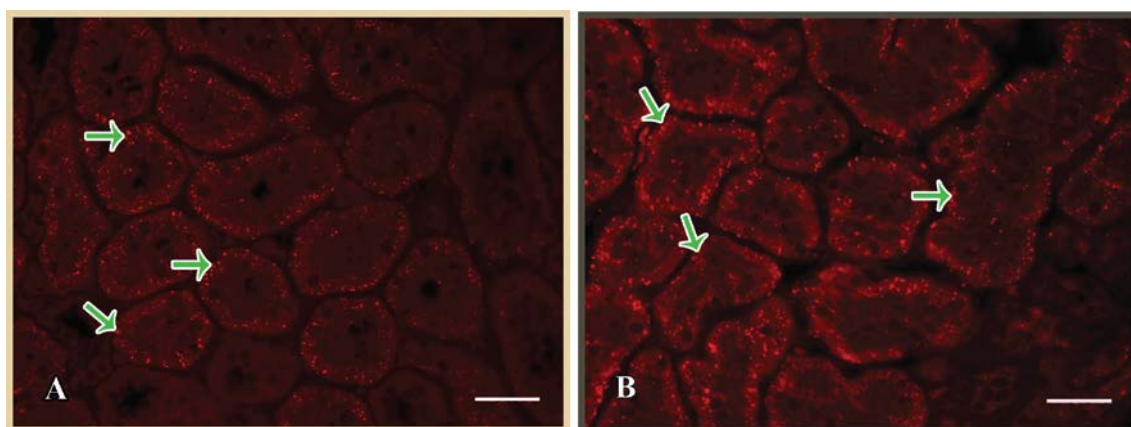
Histogram 5. „Real-time” PCR analiza iRNK za NaPi 2a kotransporter u tubulima bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^a; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^b; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^c; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D; Orx životinje hronično tretirane genisteinom, G; Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti ± SD. * p<0.05 u odnosu na Orx.

Hronični tretman TP-om je statistički značajno povećao nivo iRNK za NaPi 2a za 63% (p<0.05), a tretman Vit D za 50% (p<0.05), u poređenju sa Orx^a grupom (Histogram 5A). Hronični tretman EDP-om je statistički značajno smanjio nivo iRNK

za NaPi 2a kotransporter za 31% ($p < 0.05$), u poređenju sa Orx^a pacovima (Histogram 5A). Hronični tretmani genisteinom i daidzeinom su statistički značajno povećali nivoe iRNK za NaPi 2a kotransporter za 62% ($p < 0.05$), odnosno za 67% ($p < 0.05$), u poređenju sa Orx^b grupom (Histogram 5B). Nakon tretmana kalcijumom, nivo iRNK za NaPi 2a kotransporter je povećan u odnosu na Orx^c grupu, ali ova promena nema statističku značajnost (Histogram 5C).

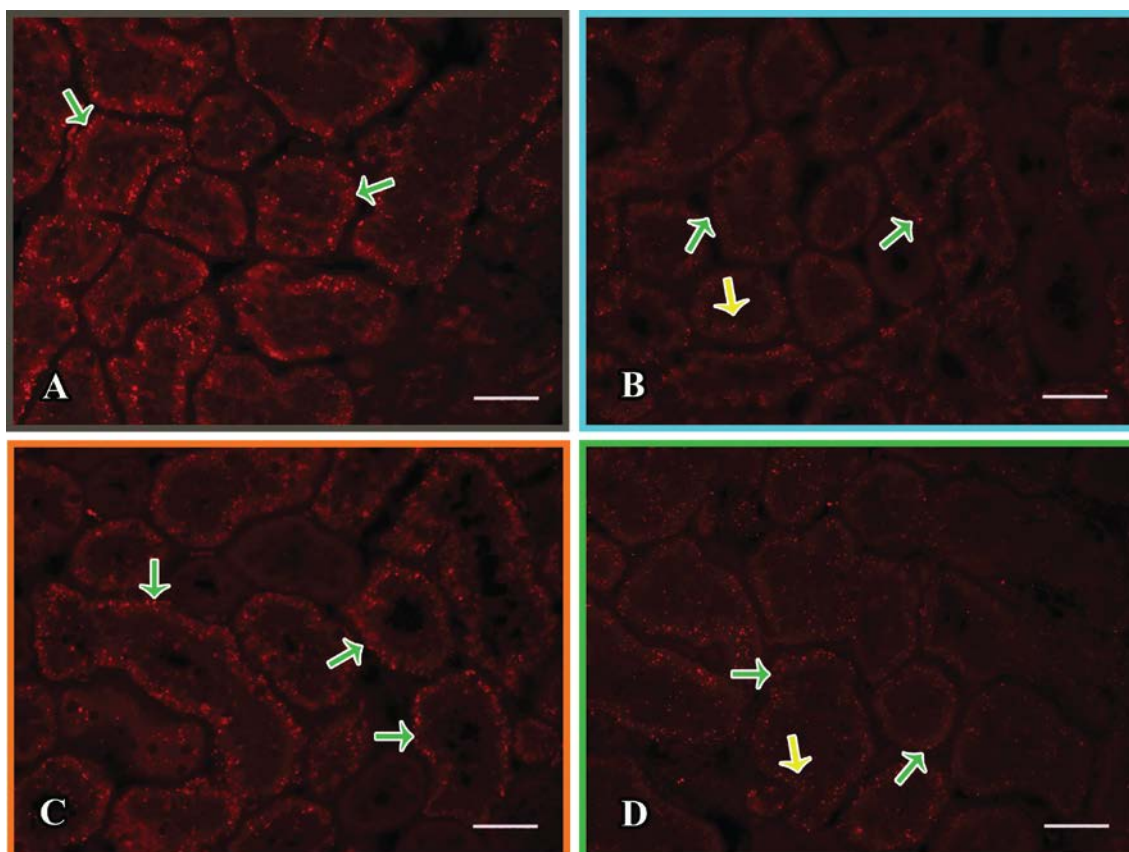
4.2.2. Imunofluorescentne karakteristike PTH1 receptora u proksimalnim tubulima bubrega kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

Kod kontrolne, SO grupe životinja uočava se izraženo prisustvo PTH1 receptora na bazolateralnom polu epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega, dok je njegova lokalizacija u četkastoj ivici epitelnih ćelija manje izražena (Slika 14A). Kod Orx pacova, intenzitet imunofluorescentno obeleženog PTH1 receptora je jači u poređenju sa SO grupom (Slika 14B). Imunofluorescentni signal se uočava i na apikalnom i bazolateralnom polu epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega Orx pacova (Slika 14B).



Slika 14. Imunofluorescentno obeležen PTH1 receptor u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) SO životinje; B) Orx životinje. Zelene strelice - bazolateralno lokalizovan PTH1 receptor. Bar – 10 μm .

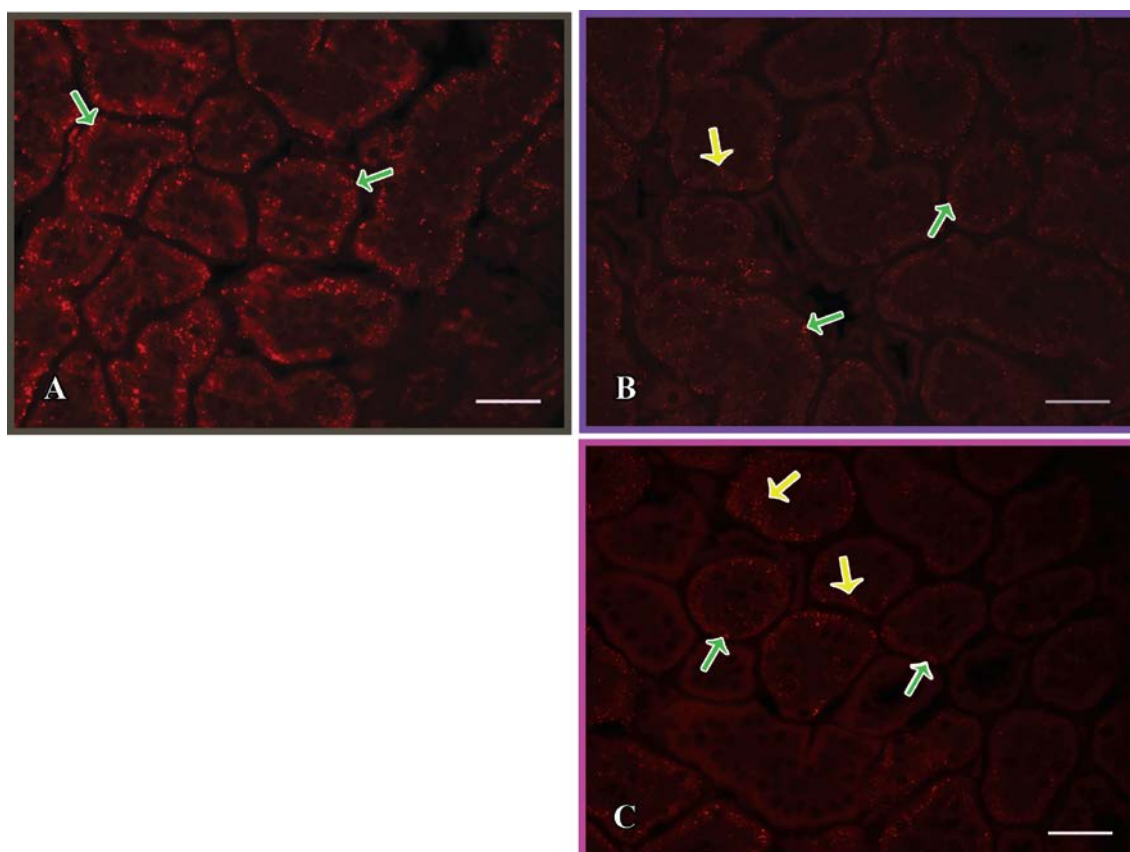
Hronični tretman TP-om je smanjio intenzitet signala imunofluorescentno obeleženog PTH1 receptora u poređenju sa Orx pacovima (Slika 15B). Nakon hroničnog tretmana EDP-om uočava se nešto slabiji intenzitet obojenosti nego kod Orx životinja (Slika 15C). Tretman Vit D je smanjio intenzitet signala imunofluorescentno obeleženog PTH1 receptora u poređenju sa Orx životinjama (Slika 15D).



Slika 15. Imunofluorescentno obeležen PTH1 receptor u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane TP-om; C) Orx životinje hronično tretirane EDP-om; D) Orx životinje hronično tretirane Vit D. Zelene strelice - bazolateralno lokalizovan PTH1 receptora, žute strelice apikalno lokalizovan PTH1 receptor. Bar – 10 μ m.

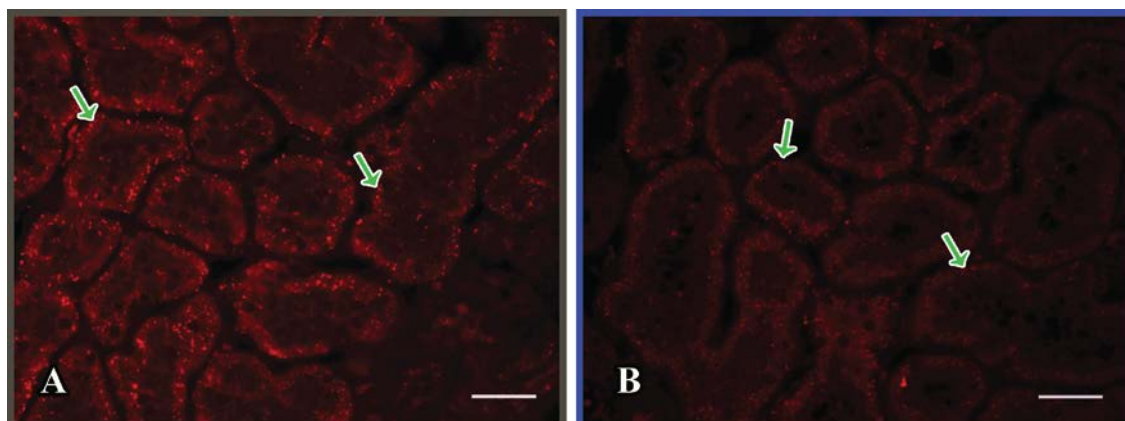
Nakon hroničnog tretmana genisteinom intenzitet imunofluorescentno obeleženog bazolateralno i apikalno lokalizovanog PTH1 receptora, u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega, je smanjen u poređenju sa Orx grupom (Slika 16B).

Hronični tretman daidzeinom je slično kao i tretman genisteinom smanjio intenzitet imunofluorescentno obeleženog PTH1 receptora u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega lokalizovanog apikalno i bazolateralno u odnosu na Orx životinje (Slika 16C).



Slika 16. Imunofluorescentno obeležen PTH1 receptor u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane genisteinom; C) Orx životinje hronično tretirane daidzeinom. Zelene strelice - bazolateralno lokalizovan PTH1 receptor, žute strelice apikalno lokalizovan PTH1 receptor. Bar – 10 μ m.

Nakon hroničnog tretmana kalcijumom, smanjen je intezitet imunofluorescence u bazolateralnom domenu epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega, u poređenju sa Orx životinjama (Slika 17B).

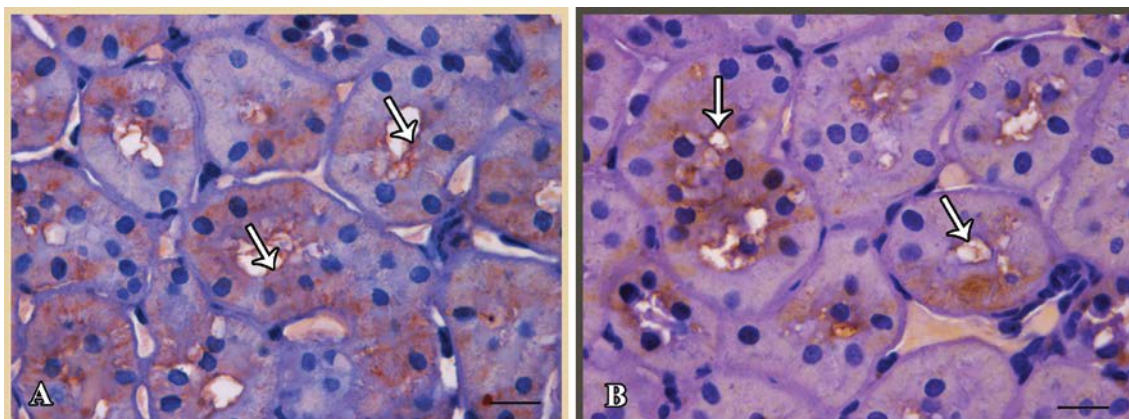


Slika 17. Imunofluorescentno obeležen PTH1 receptor u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane kalcijumom. Zelene strelice - bazolateralno lokalizovan PTH1 receptor. Bar – 10 μ m.

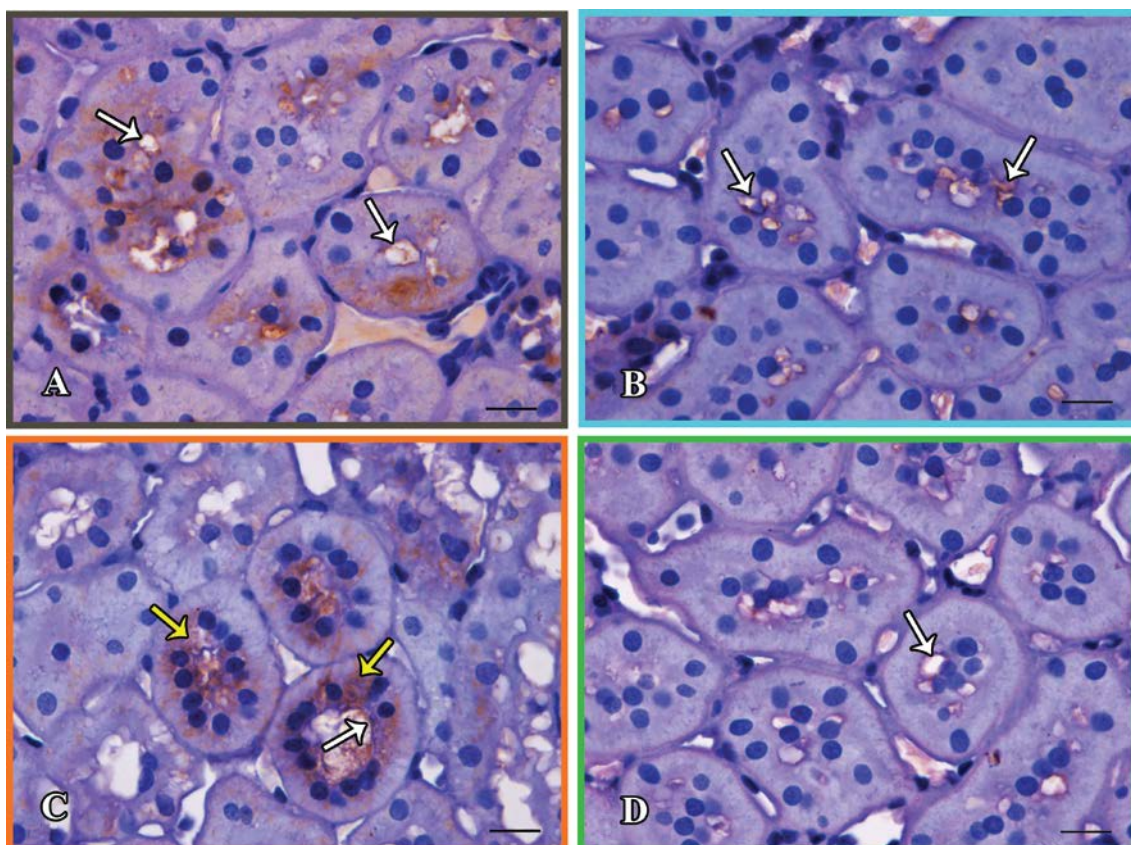
4.2.3. Imunohistohemijske karakteristike i analiza relativne ekspresije FGFR gena u distalnim tubulima bubrega kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

Na poprečnim presecima bubrega SO mužjaka pacova jasno se uočava imunoreaktivnost FGFR na apikalnom polu epitelnih ćelija distalnim tubula bubrega. Takođe, prisustvo FGFR se zapaža i u subapikalnom i bazalnom domenu epitelnih ćelija (Slika 18A). Nakon Orx uočen je sličan intenzitet obojenosti FGFR, kao i prisustvo pozitivne imunoreakcije u citoplazmi epitelnih ćelija distalnih tubula bubrega, u odnosu na SO životinje (Slika 18B).

Kod životinja hronično tretiranih TP-om, FGFR je imunocitohemijski intenzivnije obeležen u poređenju sa Orx grupom životinja, a imunoreaktivnost je ograničena na apikalni pol epitelnih ćelija distalnih tubula bubrega (Slika 19B). Nakon hroničnog tretmana EDP-om, uočava se povećanje intenziteta obojenosti FGFR u odnosu na Orx kontrolnu grupu (Slika 19C). Tretman Vit D je značajno smanjio intenzitet imunoreaktivnosti FGFR u poređenju sa Orx grupom (Slika 19D).

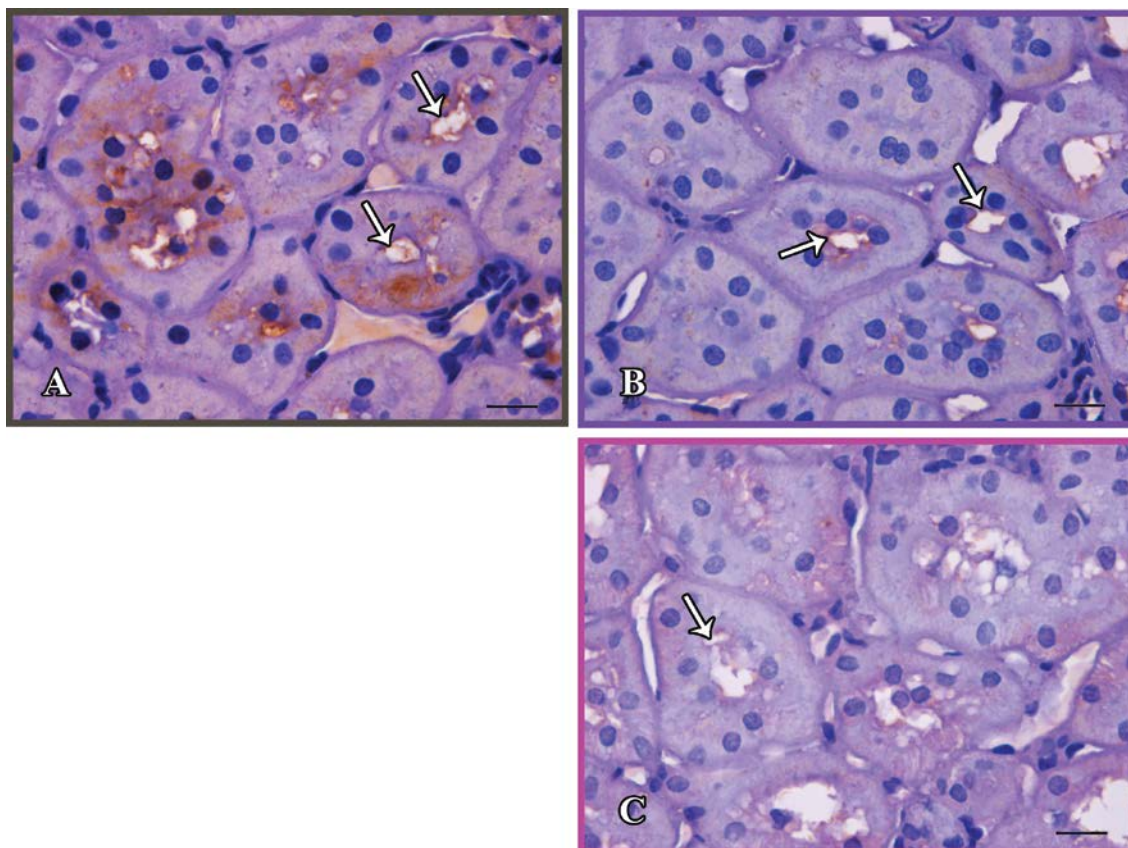


Slika 18. Imunohistohemijski obeležen FGFR u epitelnim ćelijama distalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) SO životinje; B) Orx životinje. Bele strelice - apikalno lokalizovan FGFR. Bar – 13 μ m.



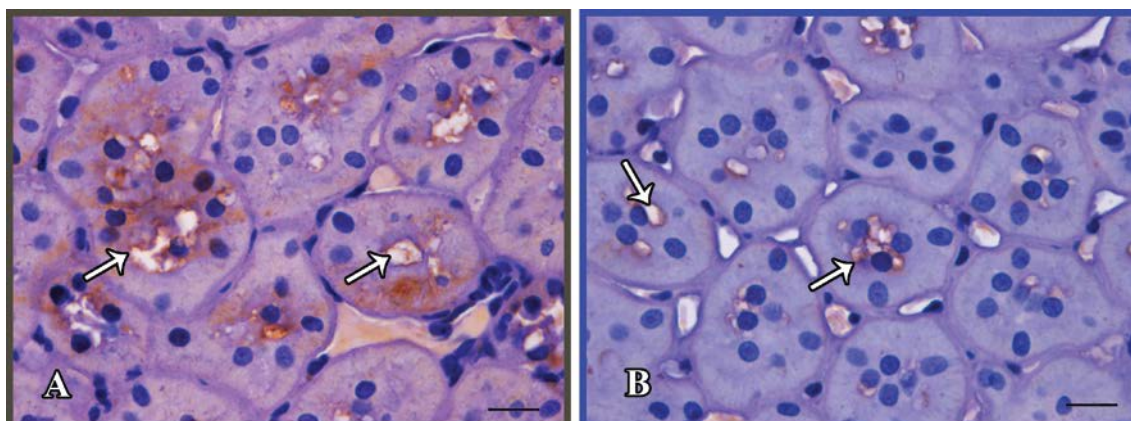
Slika 19. Imunohistohemijski obeležen FGFR u epitelnim ćelijama distalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane TP-om; C) Orx životinje hronično tretirane EDP-om; D) Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D. Bele strelice - apikalno lokalizovan FGFR, žute strelice - subapikalno lokalizovan FGFR. Bar – 13 μ m.

Nakon hroničnog tretmana genisteinom intenzitet FGFR imunoreaktivnosti je smanjen i prisutan pretežno na apikalnom polu epitelnih ćelija distalnih tubula bubrega u poređenju sa Orx grupom (Slika 20B). Intenzitet imunoreaktivnosti FGFR nakon hroničnog tretmana daidzeinom je znatno slabiji u odnosu na Orx životinje i prisutan je u apikalnom domenu epitelnih ćelija distalnih tubula bubrega (Slika 20C).



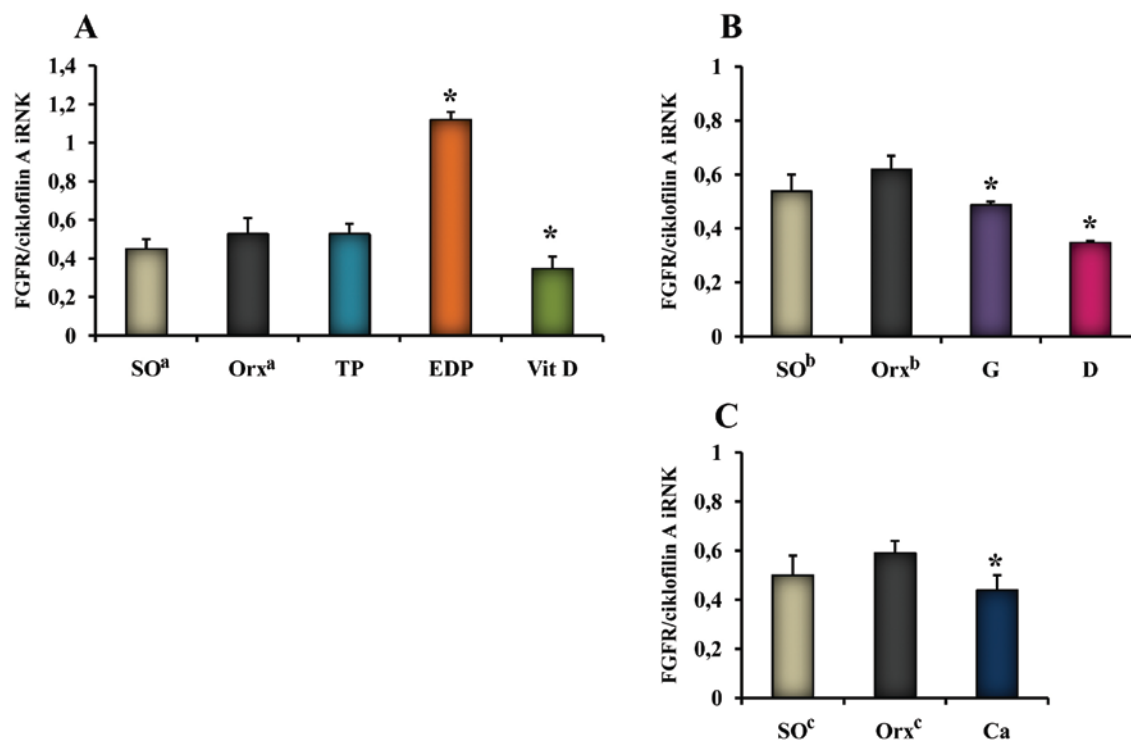
Slika 20. Imunohistohemijski obeležen FGFR u epitelnim ćelijama distalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane genisteinom; C) Orx životinje hronično tretirane daidzeinom. Bele strelice - apikalno lokalizovan FGFR. Bar – 13 μ m.

Nakon hroničnog tretmana sa Ca intenzitet obojenosti FGFR je slabiji u poređenju sa Orx pacovima i prisutan je pretežno u apikalnom domenu epitelnih ćelija distalnih tubula bubrega (Slika 21B).



Slika 21. Imunohistohemijski obeležen FGFR u epitelnim ćelijama distalnih tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane kalcijumom. Bele strelice - apikalno lokalizovan FGFR. Bar – 13 μ m.

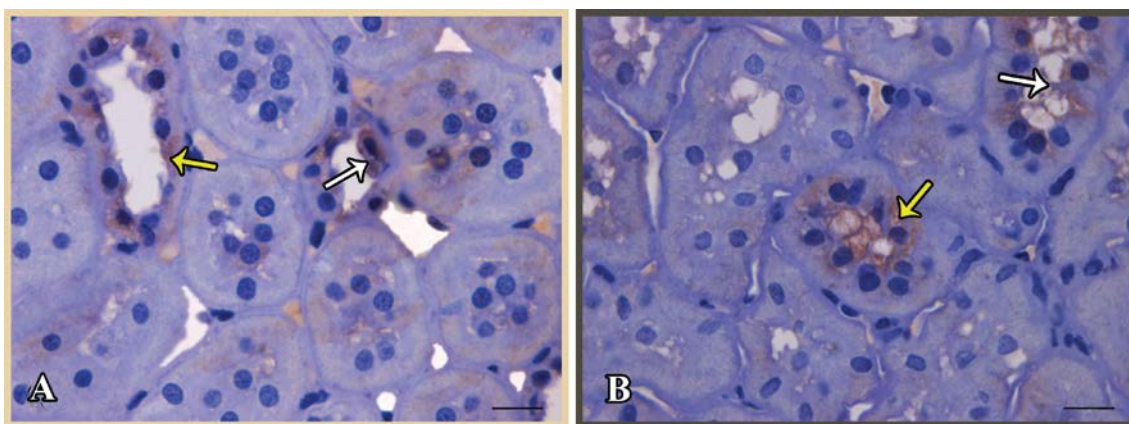
Analiza ekspresije FGFR gena u tubulima bubrega mužjaka pacova pokazuje da nedostatak polnih hormona kod svih Orx grupa neznatno povećava nivo FGFR iRNK u poređenju sa SO kontrolnim životinjama (Histogram 6A-C). Nakon hroničnog tretmana TP-om nivo FGFR iRNK je povećan, ali ne statistički značajno u poređenju sa Orx^a grupom (Histogram 6A). Hronični tretman Orx pacova EDP-om izazvao je statistički značajno povećanje nivoa FGFR iRNK za 92% ($p < 0.05$) u odnosu na Orx^a grupu životinja, dok je hronični tretman Vit D statistički značajno smanjio nivo FGFR iRNK za 34% ($p < 0.05$) u poređenju sa Orx^a životinjama (Histogram 6A). Nakon hroničnih tretmana genisteinom i daidzeinom nivoi FGFR iRNK su statistički značajno smanjeni za 21% ($p < 0.05$), odnosno za 44% ($p < 0.05$), u odnosu na Orx^b vrednosti (Histogram 6B). Hronični tretman sa Ca je izazvao statistički značajno smanjenje nivoa FGFR iRNK za 26% ($p < 0.05$) u odnosu na Orx^c pacove (Histogram 6C).



Histogram 6. „Real-time” PCR analiza FGFR iRNK u tubulima bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^a; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^b; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^c; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D; Orx životinje hronično tretirane genisteinom, G; Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti ± SD. * p<0.05 u odnosu na Orx.

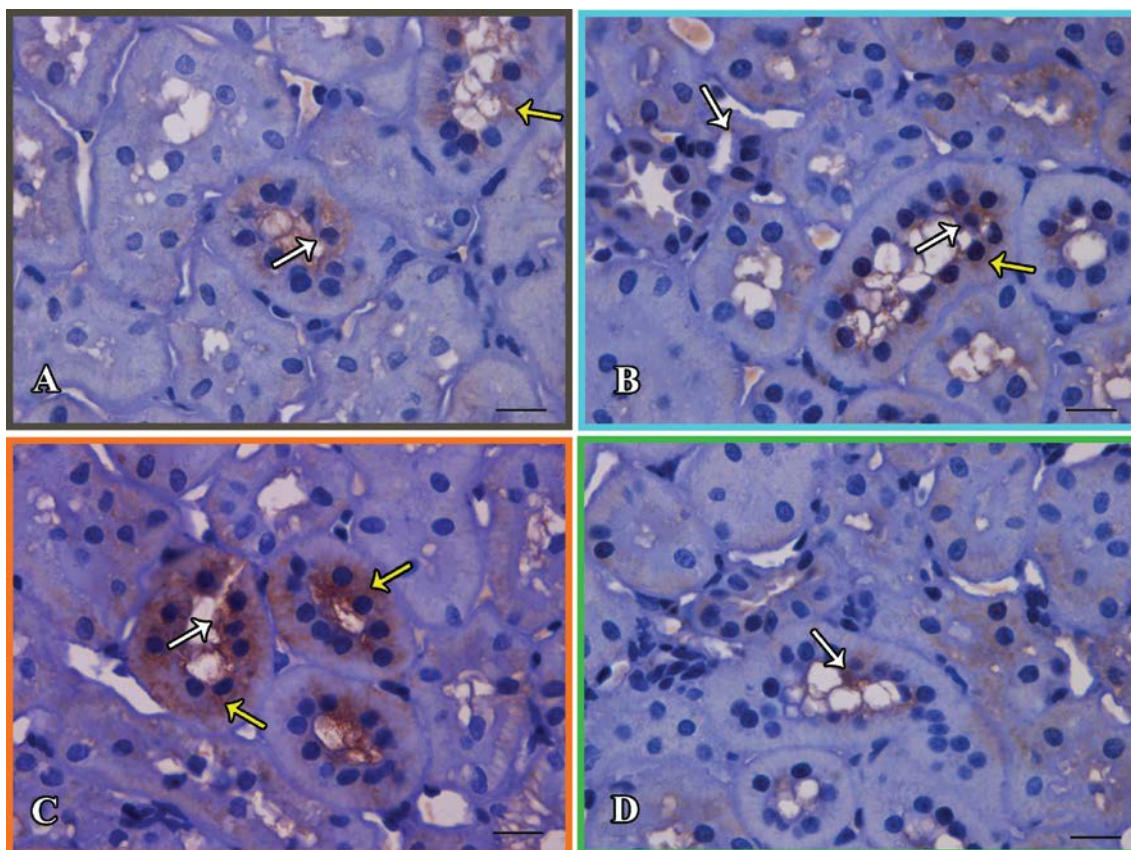
4.2.4. Imunohistohemijske karakteristike i analiza relativne ekspresije gena za Klotho receptor u tubulima bubrega kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

Kod kontrolne SO grupe životinja imunoreaktivnost Klotho receptora uočava se u apikalnom i subapikalnom domenu epitelnih ćelija tubula bubrega (Slika 22A). Kod Orx životinja intenzitet imunoreaktivnosti obeleženog Klotho receptora nije promenjen u poređenju sa SO životinjama (Slika 22B).



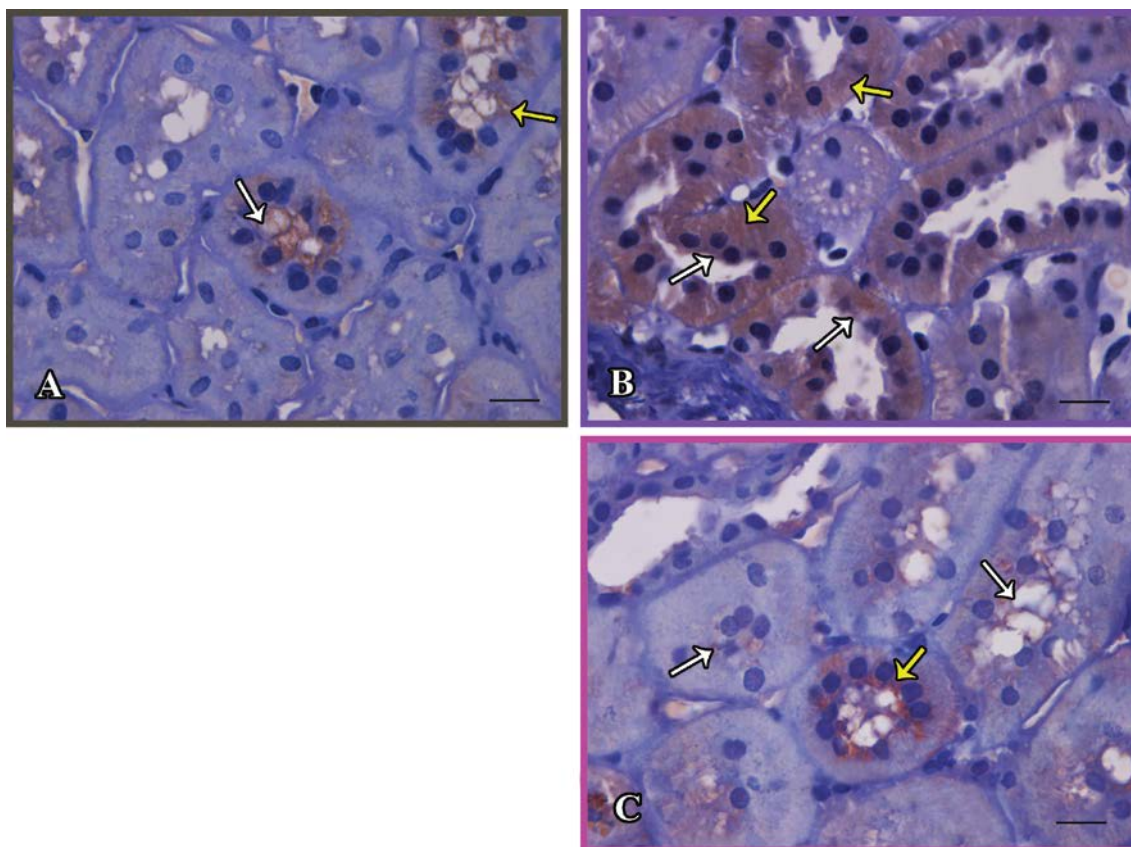
Slika 22. Imunohistohemijski obeležen Klotho receptor u epitelnim ćelijama tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) SO životinje; B) Orx životinje. Bele strelice-apikalno lokalizovan Klotho receptor, žute strelice - subapikalno lokalizovan Klotho receptor. Bar – 13 μ m.

Nakon hroničnog tretmana TP-om intenzitet imunoreaktivnosti Klotho receptora nije značajno promenjen u odnosu na Orx grupu životinja. Imunoreaktivnost je ograničena pretežno na apikalni i subapikalni domen epitelnih ćelija tubula (Slika 23B). Hronični tretman EDP-om je izazvao značajno povećanje intenziteta imunoreaktivnosti Klotho receptora u apikalnom i subapikalnom domenu epitelnih ćelija tubula bubrega, u poređenju sa Orx pacovima (Slika 23C). Intenzitet obojenosti apikalno lokalizovanog Klotho receptora epitelnih ćelija tubula bubrega smanjen je nakon hroničnog tretmana Vit D, u odnosu na Orx životinje (Slika 23D).



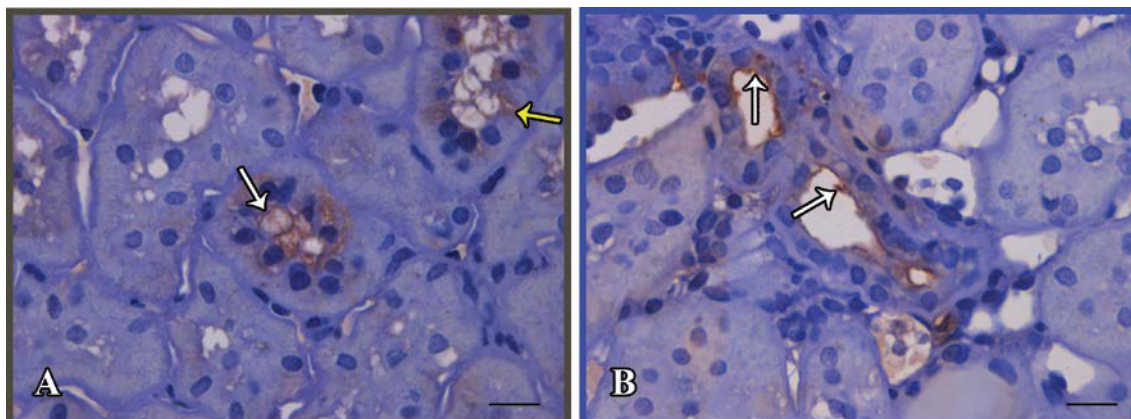
Slika 23. Imunohistohemijski obeležen Klotho receptor u epitelnim ćelijama tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane TP-om; C) Orx životinje hronično tretirane EDP-om; D) Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D. Bele strelice - apikalno lokalizovan Klotho receptor, žute strelice - subapikalno lokalizovan Klotho receptor. Bar – 13 μ m.

Nakon hroničnog tretmana genisteinom uočava se značajno povećan i ravnomerno raspoređen intenzitet obojenosti Klotho receptora, kako u apikalnom i bazalnom domenu tako i u citoplazmi epitelnih ćelija tubula, u odnosu na Orx grupu životinja (Slika 24B). Hronični tretman daidzeinom neznatno je smanjio intenzitet obojenosti Klotho receptora koji se uočava u apikalnom i subapikalnom domenu epitelnih ćelija tubula bubrega, u poređenju sa Orx životinjama (Slika 24C).



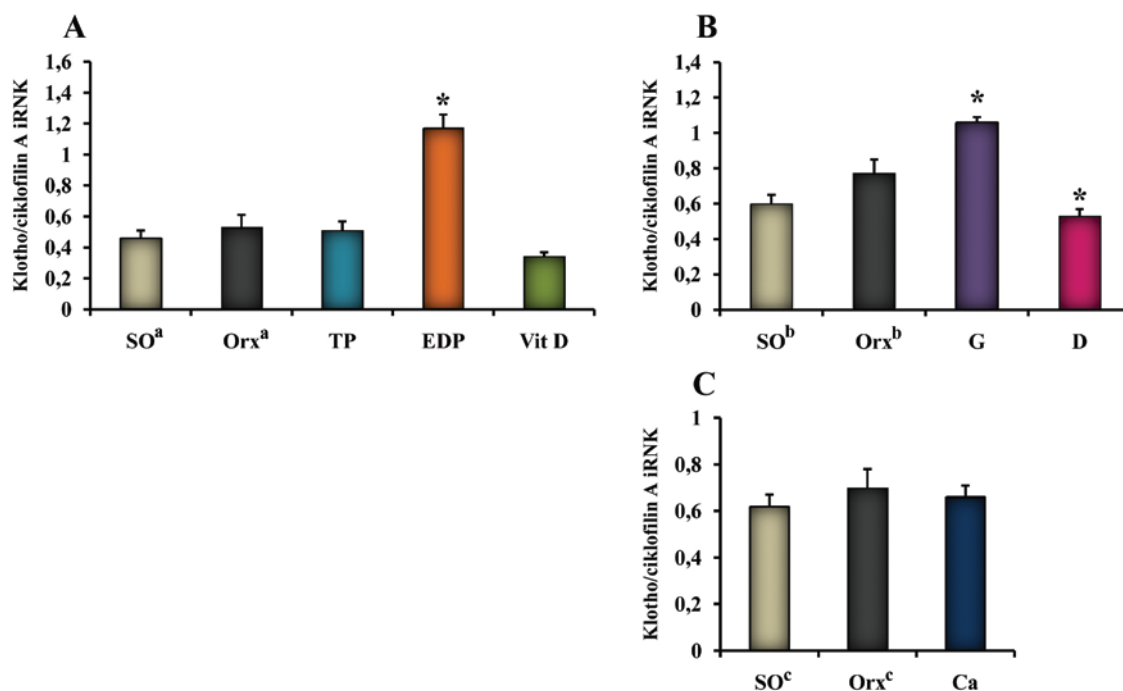
Slika 24. Imunohistohemijski obeležen Klotho receptor u epitelnim ćelijama tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane genisteinom; C) Orx životinje hronično tretirane daidzeinom. Bele strelice - apikalno lokalizovan Klotho receptor, žute strelice - subapikalno lokalizovan Klotho receptor. Bar – 13 μ m.

Hronični tretman kalcijumom nije uzrokovao promenu u intenzitetu obojenosti imunohistohemijski obeleženog Klotho receptora lokalizovanog pretežno u apikalnom domenu epitelnih ćelija tubula, u odnosu na Orx životinje (Slika 25B).



Slika 25. Imunohistohemijski obeležen Klotho receptor u epitelnim ćelijama tubula bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. A) Orx životinje; B) Orx životinje hronično tretirane kalcijumom. Bele strelice - apikalno lokalizovan Klotho receptor. Bar – 13 μ m.

Analiza ekspresije gena za Klotho receptor u tubulima bubrega andropauzalnih mužjaka pacova pokazuje da je nakon orhidektomije kod svih Orx grupa životinja nivo iRNK za Klotho receptor neznatno povećan, ali ne statistički značajno u poređenju sa adekvatnim kontrolnim SO životinjama (Histogram 7A-C). Hronični tretmani TP-om i Vit D su smanjili nivo iRNK za Klotho receptor, ali ne statistički značajno u poređenju sa Orx^a grupom (Histogram 7A). Nakon hroničnog tretmana Orx pacova EDP-om, nivo iRNK za Klotho receptor je statistički značajno povećan za 90% ($p < 0.05$) u odnosu na Orx^a grupu životinja (Histogram 7A). Nakon hroničnog tretmana genisteinom, nivo iRNK za Klotho receptor je statistički značajno povećan za 38% ($p < 0.05$), dok je hronični tretman daidzeinom statistički značajno smanjio nivo iRNK za Klotho receptor za 32% ($p < 0.05$), u odnosu na Orx^b grupu (Histogram 7B). Hronični tretman sa Ca nije izazvao statistički značajno smanjenje nivoa iRNK za Klotho receptor u poređenju sa Orx^c životinjama (Histogram 7C).



Histogram 7. „Real-time” PCR analiza iRNK za Klotho receptor u tubulima bubrega andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^a; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^b; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^c; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D; Orx životinje hronično tretirane genisteinom, G; Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti ± SD. * p<0.05 u odnosu na Orx.

4.3. Biohemijski parametri u serumu i urinu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

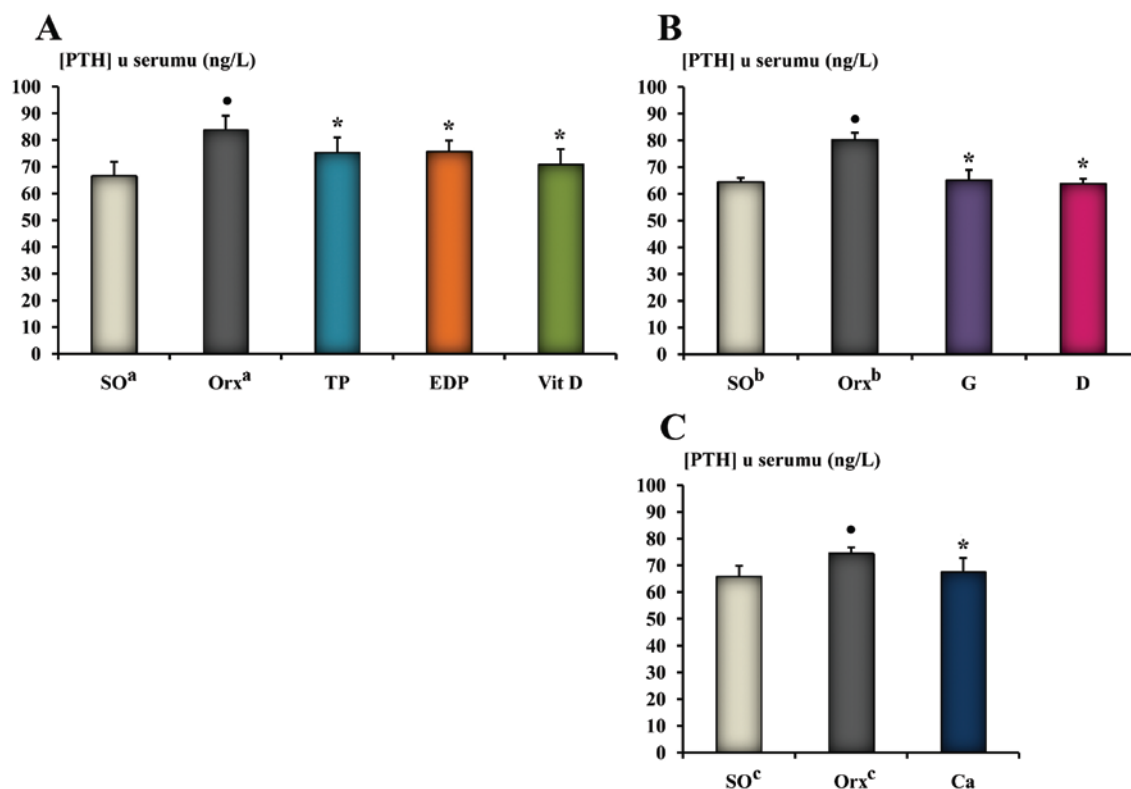
4.3.1. Koncentracija parathormona u serumu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

Koncentracija PTH u serumu kod SO^a grupe životinja je iznosila 66.60±5.24 ng/l (Histogram 8A). Nakon Orx^a koncentracija PTH je statistički značajno povećana za 26% (p<0.05), u poređenju sa istom vrednosti kod SO^a eksperimentalne grupe. Tretman TP-om je statistički značajno smanjio koncentraciju PTH u serumu za 11% (p<0.05), u odnosu na isti parametar kod Orx^a grupe.

Tretman EDP-om je statistički značajno smanjio koncentraciju PTH za 10% (p<0.05), a tretman Vit D za 15% (p<0.05) u odnosu na odgovarajuće vrednosti kod Orx^a grupe (Histogram 8A).

Koncentracija PTH u serumu SO^b kontrolne grupe životinja iznosila je 64.60±1.39 ng/l. Kod Orx^b grupe životinja koncentracija PTH u serumu je statistički značajno povećana za 24% (p<0.05), dok su hronični tretmani genisteinom i daidzeinom statistički značajno smanjili koncentraciju PTH za 19% (p<0.05), odnosno za 21% (p<0.05), u poređenju sa Orx^b grupom životinja (Histogram 8B).

Kod kontrolne SO^c grupe koncentracija PTH u serumu je iznosila 65.96±3.96 ng/l. Orhidektomija je izazvala statistički značajno povećanje koncentracije PTH kod Orx^c grupe životinja za 14% (p<0.05), u odnosu na SO^c vrednost. Nakon tretmana sa Ca koncentracija PTH u serumu je statistički značajno smanjena za 9% (p<0.05) u poređenju sa koncentracijom kod Orx^c životinja (Histogram 8C).



Histogram 8. Koncentracija parathormona u serumu (PTH; ng/l) andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^a; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^b; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^c; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D; Orx životinje hronično tretirane genisteinom, G; Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti ± SD. * p<0.05 u odnosu na Orx.

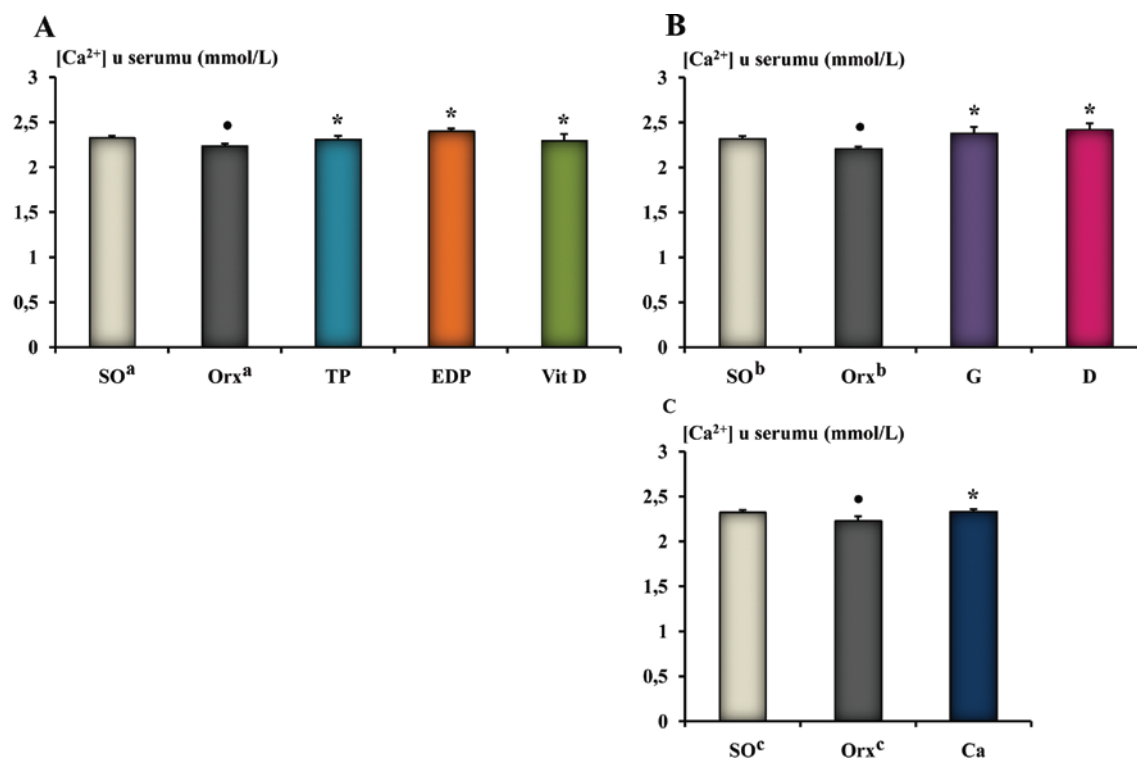
4.3.2. Koncentracija kalcijuma u serumu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavinima i kalcijumom

Koncentracija Ca²⁺ u serumu kod SO^a životinja je iznosila 2.33±0.02 mmol/l, dok je nakon Orx^a ova koncentracija statistički značajno smanjena za 4% (p<0.05) u poređenju sa SO^a grupom (Histogram 9A). Nakon tretmana TP-om, koncentracija Ca²⁺ je statistički značajno povećana za 3% (p<0.05), dok je tretman EDP-om statistički

značajno povećao koncentraciju Ca^{2+} u serumu za 7% ($p < 0.05$), u odnosu na odgovarajuće vrednosti kod Orx^a grupe životinja. Tretman Vit D je statistički značajno povećao koncentraciju Ca^{2+} u serumu za 3% ($p < 0.05$) u poređenju sa istom koncentracijom kod Orx^a životinja (Histogram 9A).

Koncentracija Ca^{2+} u serumu kod SO^b životinja je iznosila 2.32 ± 0.03 mmol/l, dok je nakon Orx^b koncentracija Ca^{2+} statistički značajno smanjena za 5% ($p < 0.05$) (Histogram 9B). Hronični tretmani genisteinom i daidzeinom su uzrokovali statistički značajno povećanje koncentracije Ca^{2+} u serumu za 8% ($p < 0.05$), odnosno 10% ($p < 0.05$), u poređenju sa odgovarajućom vrednosti kod Orx^b životinja (Histogram 9B).

Koncentracija Ca^{2+} u serumu kod SO^c grupe životinja je iznosila 2.32 ± 0.03 mmol/l (Histogram 9C). Kod Orx^c grupe koncentracija Ca^{2+} u serumu je statistički značajno smanjena za 3% ($p < 0.05$) u poređenju sa SO^c vrednošću, dok je hroničan tretman sa Ca uzrokovao statistički značajno povećanje koncentracije Ca^{2+} u serumu za 3% ($p < 0.05$) u poređenju sa i istom koncentracijom kod Orx^c grupe životinja (Histogram 9C).



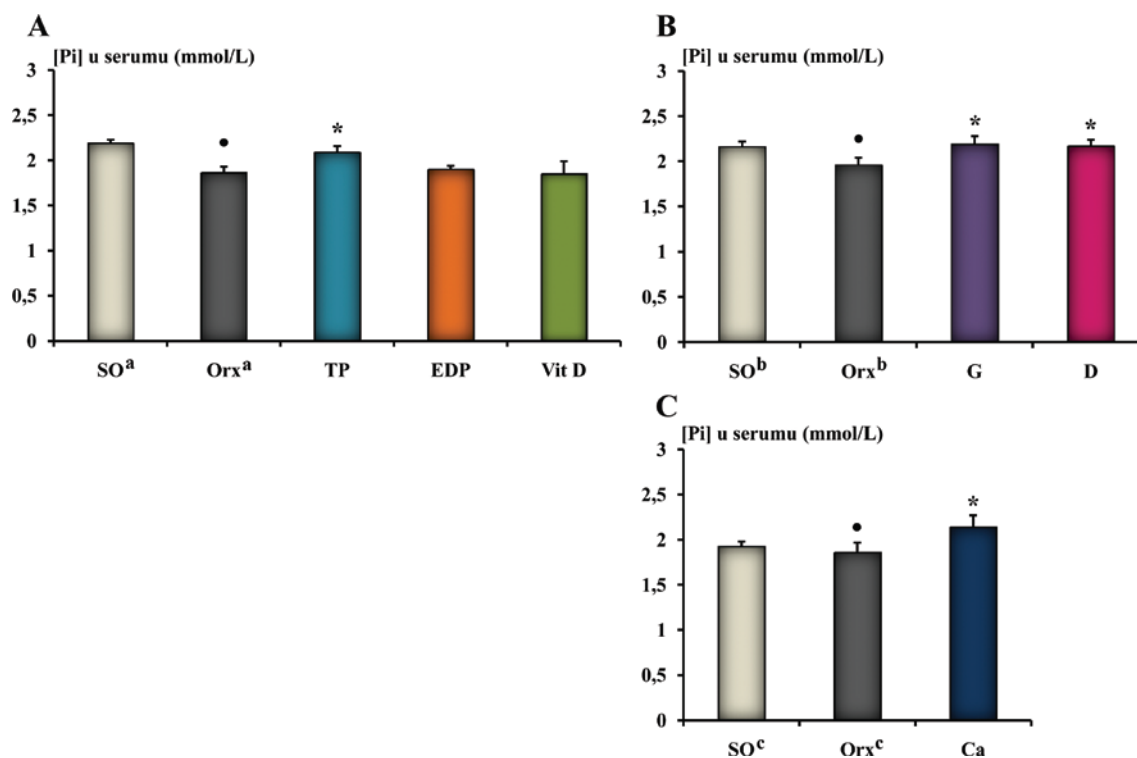
Histogram 9. Koncentracija kalcijuma u serumu (Ca^{2+} ; mmol/l) andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^{a} ; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^{b} ; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^{c} ; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^{a} ; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^{b} ; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^{c} ; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D; Orx životinje hronično tretirane genisteinom, G; Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na Orx.

4.3.3. Koncentracija fosfora u serumu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

Koncentracija Pi u serumu kod SO^a kontrolne grupe je iznosila 2.19±0.04 mmol/l (Histogram 10A). Nakon Orx^a, nivo Pi u serumu je statistički značajno smanjen za 15% (p<0.05) u odnosu na SO^a grupu životinja. Koncentracija Pi u serumu nakon tretmana TP-om je statistički značajno povećana za 12% (p<0.05) u poređenju sa Orx^a grupom. Nakon tretmana EDP-om ili Vit D, koncentracije Pi nisu statistički značajno promenjene u odnosu na Orx^a grupu životinja (Histogram 10A).

Vrednost koncentracije Pi u serumu kod SO^b grupe životinja je iznosila 2.16±0.06 mmol/l (Histogram 10B). Kod Orx^b grupe životinja, koncentracija Pi u serumu je statistički značajno smanjena za 10% (p<0.05) u odnosu na SO^b vrednost. Nakon hroničnih tretmana genisteinom i daidzeinom koncentracije Pi u serumu su statistički značajno povećane za 12% (p<0.05), odnosno 11% (p<0.05), u poređenju sa odgovarajućom vrednosti Orx^b grupe životinja (Histogram 10B).

Koncentracija Pi u serumu kod SO^c životinja je iznosila 1.93±0.05 mmol/l. Nakon Orx^c koncentracija Pi u serumu je statistički značajno smanjena za 4% (p<0.05), dok je tretman sa Ca statistički značajno povećao koncentraciju Pi u serumu za 15% (p<0.05) u odnosu na odgovarajuće vrednosti kod Orx^c grupe životinja (Histogram 10C).



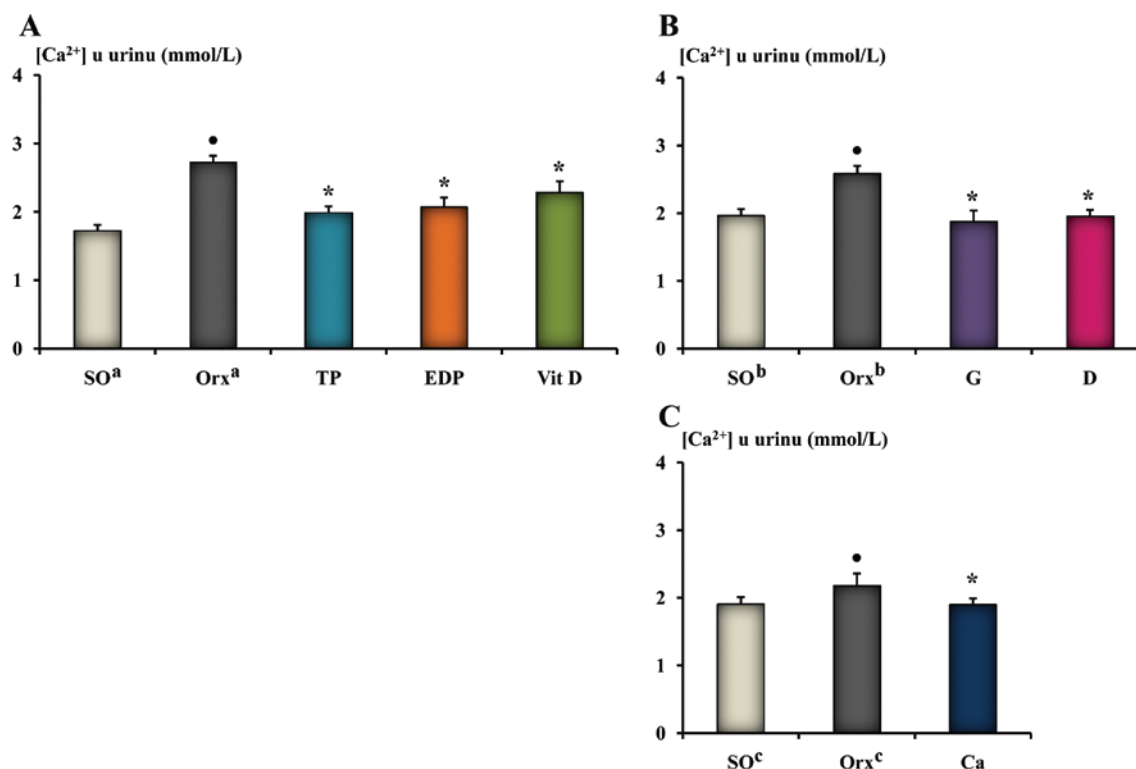
Histogram 10. Koncentracija fosfora u serumu (Pi; mmol/l) andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^a; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^b; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^c; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D; Orx životinje hronično tretirane genisteinom, G; Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti \pm SD. • $p < 0.05$ u odnosu na SO, * $p < 0.05$ u odnosu na Orx.

4.3.4. Koncentracija kalcijuma u urinu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

Koncentracija Ca^{2+} u urinu kod SO^a kontrolne grupe životinja je iznosila 1.73 ± 0.08 mmol/l (Histogram 11A). Nedostatak polnih hormona izazvan Orx^a uzrokovao je statistički značajno povećanje koncentracije Ca^{2+} u urinu za 58% ($p < 0.05$) u poređenju sa SO^a kontrolnom grupom životinja. Tretman TP-om je statistički značajno smanjio koncentraciju Ca^{2+} u urinu za 27% ($p < 0.05$), a tretman EDP-om za 24% ($p < 0.05$), u odnosu na odgovarajuće vrednosti kod Orx^a životinja. Nakon tretmana Orx životinja Vit D koncentracija Ca^{2+} u urinu je statistički značajno smanjena za 16% ($p < 0.05$) u poređenju sa Orx^a životinjama (Histogram 11A).

Koncentracija Ca^{2+} u urinu kod SO^b kontrolnih životinja je iznosila 1.97 ± 0.09 mmol/l (Histogram 11B). Nedostatak polnih hormona izazvan Orx^b uzrokovao je statistički značajno povećanje koncentracije Ca^{2+} u urinu za 32% ($p < 0.05$) u poređenju sa SO^b kontrolnom grupom životinja. Nakon hroničnih tretmana genisteinom i daidzeinom koncentracije Ca^{2+} u urinu su statistički značajno smanjene za 27% ($p < 0.05$), odnosno 24% ($p < 0.05$), u poređenju sa odgovarajućim vrednostima kod Orx^b životinja (Histogram 11B).

Koncentracija Ca^{2+} u urinu kod kontrolne SO^c grupe je iznosila 1.91 ± 0.1 mmol/l (Histogram 11C). Nakon Orx^c , koncentracija Ca^{2+} u urinu je statistički značajno povećana za 14% ($p < 0.05$) u poređenju sa istom vrednosti kod SO^c eksperimentalne grupe. Tretman sa Ca je statistički značajno smanjio koncentraciju Ca^{2+} u urinu za 12% ($p < 0.05$) u odnosu na isti parametar kod Orx^c grupe životinja (Histogram 11C).



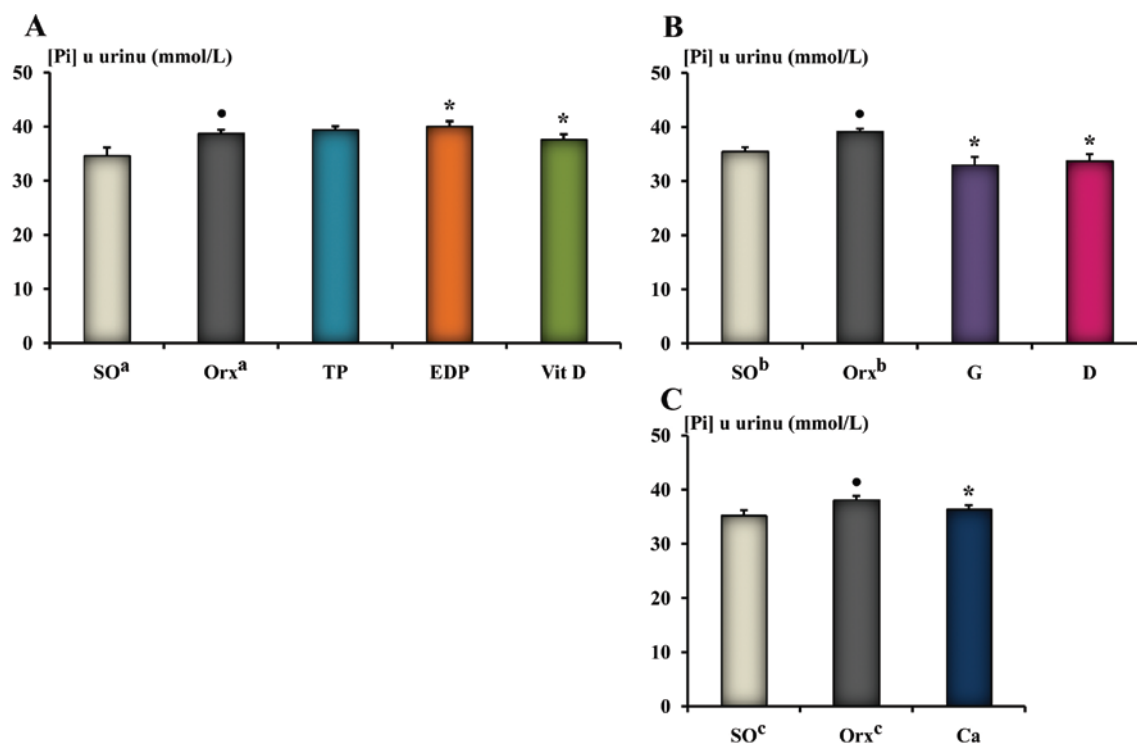
Histogram 11. Koncentracije kalcijuma u urinu (Ca²⁺; mmol/l) andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^a; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^b; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^c; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D; Orx životinje hronično tretirane genisteinom, G; Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti ± SD. • p<0.05 u odnosu na SO, * p<0.05 u odnosu na Orx.

4.3.5. Koncentracija fosfora u urinu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

Koncentracija Pi u urinu kod kontrolne SO^a grupe životinja je iznosila 34.59±1.57 mmol/l (Histogram 12A). Nakon Orx^a, koncentracija Pi u urinu je statistički značajno povećana za 12% (p<0.05) u poređenju sa istom vrednosti kod SO^a eksperimentalne grupe. Hronični tretman TP-om je povećao koncentraciju Pi u urinu u odnosu na isti parametar kod Orx^a grupe, ali ne statistički značajno. Tretman EDP-om je statistički značajno povećao koncentraciju Pi u urinu za 3% (p<0.05) dok je hronični tretman Vit D statistički značajno smanjio koncentraciju Pi u urinu za 3% (p<0.05) u odnosu na odgovarajuće vrednosti kod Orx^a grupe (Histogram 12A).

Vrednost koncentracija Pi u urinu kod kontrolne SO^b grupe životinja je iznosila 35.53±0.75 mmol/l (Histogram 12B). Nakon Orx^b koncentracija Pi u urinu je statistički značajno povećana za 11% (p<0.05) u odnosu na SO^b grupu. Hronični tretmani Orx životinja genisteinom i daidzeinom su statistički značajno smanjili koncentraciju Pi u urinu za 16% (p<0.05), odnosno 14% (p<0.05), u poređenju sa njegovom koncentracijom u urinu Orx^b grupe životinja (Histogram 12B).

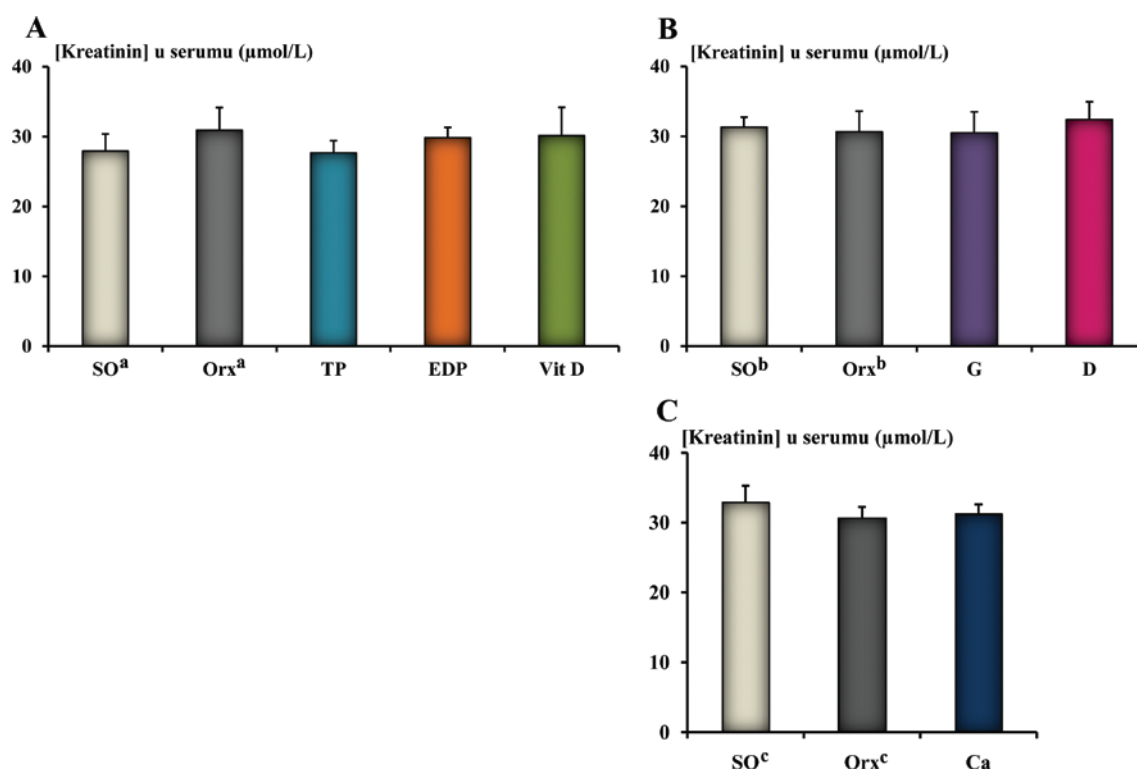
Koncentracija Pi u urinu kod kontrolne SO^c grupe pacova je iznosila 35.22±0.98 mmol/l, dok je nakon Orx^c ova koncentracija u urinu statistički značajno povećana za 8% (p<0.05) u odnosu na SO^c vrednost (Histogram 12C). Nakon tretmana sa Ca koncentracija Pi u urinu je statistički značajno smanjena za 5% (p<0.05) u poređenju sa odgovarajućom vrednosti kod Orx^c životinja (Histogram 12C).



Histogram 12. Koncentracije fosfora u urinu (Pi; mmol/l) andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^a; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^b; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^c; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D; Orx životinje hronično tretirane genisteinom, G; Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti ± SD. • p<0.05 u odnosu na SO, * p<0.05 u odnosu na Orx.

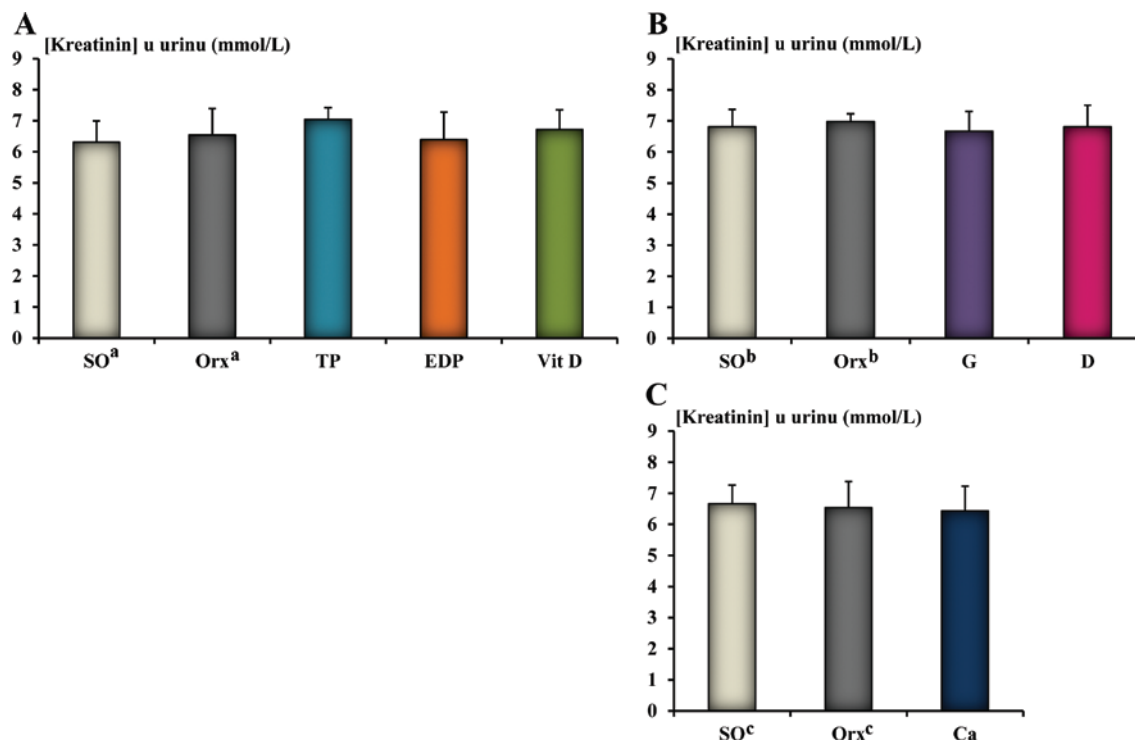
4.3.6. Koncentracija kreatinina u serumu i urinu kontrolnih i orhidektomisanih pacova nakon tretmana steroidima, izoflavonima i kalcijumom

Promene u koncentraciji kreatinina u serumu kod SO i Orx grupa, kao i grupa koje su nakon Orx tretirane TP-om, EDP-om, Vit D, genisteinom, daidzeinom ili kalcijumom nisu pokazale statističku značajnost (Histogram 13A-C).



Histogram 13. Koncentracije kreatinina u serumu ($\mu\text{mol/l}$) andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^a; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^b; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^c; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D; Orx životinje hronično tretirane genisteinom, G; Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti \pm SD. • $p < 0.05$ u odnosu na SO, * $p < 0.05$ u odnosu na Orx.

Koncentracije kreatinina u urinu kod svih kontrolnih i tretiranih grupa nisu pokazale statistički značajne promene u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima (Histogram 14A-C).



Histogram 14. Koncentracije kreatinina u urinu (mmol/l) andropauzalnih mužjaka pacova. Lažno operisane životinje tretirane maslinovim uljem, SO^a; lažno operisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, SO^b; lažno operisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, SO^c; orhidektomisane životinje tretirane maslinovim uljem, Orx^a; orhidektomisane životinje tretirane mešavinom maslinovog ulja i apsolutnog alkohola, Orx^b; orhidektomisane životinje tretirane fiziološkim rastvorom, Orx^c; Orx životinje hronično tretirane testosteron-propionatom, TP; Orx životinje hronično tretirane estradiol-dipropionatom, EDP; Orx životinje hronično tretirane vitaminom D, Vit D; Orx životinje hronično tretirane genisteinom, G; Orx životinje hronično tretirane daidzeinom, D; Orx životinje hronično tretirane kalcijumom, Ca. Prikazane su srednje vrednosti ± SD. • p<0.05 u odnosu na SO, * p<0.05 u odnosu na Orx.

5. Diskusija

Paraštitaste žlezde imaju centralnu ulogu u regulaciji homeostaze Ca^{2+} i Pi, kao i metabolizma koštanog tkiva (Galitzer i sar., 2008). Povećanje koncentracije PTH u cirkulaciji tokom procesa starenja (Halloran i sar., 2002), zajedno sa postepenim snižavanjem koncentracije testosterona u cirkulaciji, značajno doprinose gubitku mase koštanog tkiva i nastanku osteoporoze. Inhibitoran efekat PTH na ekspresiju i aktivnost NaPi 2a kotransportera rezultuje u ekskreciji Pi, što doprinosi narušavanju homeostaze Pi i intenziviranju procesa resorpcije koštanog tkiva. Tokom procesa starenja smanjuje se ekspresija Klotho proteina u bubregu što značajno doprinosi smanjenoj reapsorpciji Ca^{2+} i aktivnosti TRPV5 (Mensenkamp i sar., 2006).

Korišćenje supstitucione terapije steroidnim hormonima u svrhu ublažavanja simptoma starenja može izazvati hiperfosfaturiju (Uemura i sar., 2000), kao i povećati rizik od nastanka kancera (Moutsatsou, 2007), pa je stoga neophodno iznalaženje alternativnih terapijskih rešenja u lečenju osteoporoze. Kod starih osoba postoji deficit Ca^{2+} , zbog sniženog stepena apsorpcije Ca^{2+} u tankom crevu i snižene koncentracije Vit D u cirkulaciji, te je korišćenje suplemenata Ca^{2+} i Vit D u terapiji osteoporoze široko rasprostranjeno, mada i ovi medikamenti ispoljavaju neželjene efekte (Gennari, 2001; Tang i sar., 2007; Nuti, 2012). Postoje podaci o mehanizmima delovanja izoflavona, njihovom uticaju i potencijalnoj upotrebi u prevenciji i tretmanu simptoma starenja kod oba pola (Adlercreutz i Mazur, 1997; Yan i sar., 2011; Li i sar., 2011). Međutim, studije koje se bave istraživanjem efekata izoflavona na strukturu i funkciju ključnih regulatora homeostaze Ca^{2+} i Pi su malobrojne. U ovom istraživanju ispitivano je delovanje steroidnih hormona, izoflavona i kalcijuma na strukturu i funkciju paraštitastih žlezda, imunocitohemijske karakteristike i relativnu ekspresiju gena specifičnih funkcionalnih

proteina u tubulima bubrega kod Orx mužjaka pacova srednjeg životnog doba, kao adekvatanog animalnog modela andropauze.

U našim eksperimentalnim uslovima Orx izaziva značajno povećanje volumena paraštitastih žlezda i povećanje koncentracije PTH u serumu, u poređenju sa lažno operisanom kontrolnom grupom životinja. Ultrastrukturnom analizom glavnih ćelija paraštitastih žlezda Orx pacova uočene su brojne interdigitacije ćelijske membrane, dobro razvijen gER i Goldži kompleks i mnogobrojne mitohondrije u citoplazmi u odnosu na glavne ćelije kontrolnih životinja. Navedene ultrastrukturne karakteristike ukazuju na povećanu sekretornu aktivnost glavnih ćelija paraštitastih žlezda i u skladu su sa studijom Coleman i Silbermann (1978). Takođe, Orx uzrokuje značajno smanjenje koncentracije Ca^{2+} u serumu u poređenju sa kontrolnom grupom životinja, što je u skladu sa studijom Filipović i saradnika (2007) i može predstavljati posledicu smanjene aktivnosti TRPV5 i povećanog izlučivanja Ca^{2+} urinom (Prince, 1994; Hoenderop i sar., 2002). Usled nedostatka polnih steroida kod Orx životinja moguće je smanjenje aktivacionog signala za sintezu i sekreciju FGF23, a kao posledica toga inhibicija sinteze i sekrecije PTH, pa je koncentracija PTH u serumu kod Orx životinja povećana. Takođe, smanjena koncentracija Ca^{2+} u serumu nakon Orx može doprineti povećanju koncentracije PTH u cirkulaciji, jer je poznato da je hipokalcemija glavni stimulatorni faktor sekrecije PTH (Galitzer i sar., 2008). Pored toga, niska koncentracija Ca^{2+} u serumu reguliše stabilnost iRNK za PTH na posttranskripcionom nivou, i omogućava interakciju RNK-vezujućih proteina sa iRNK za PTH (Naveh-Many, 2010).

Hronični tretmani Orx životinja TP-om, odnosno EDP-om uzrokovali su značajno smanjenje volumena paraštitastih žlezda. Tretman EDP-om je značajno smanjio volumensku gustinu glavnih ćelija na račun povećanja volumenske gustine

intersticijuma. Analiza ultratankih preseka glavnih ćelija paraštitastih žlezda nakon tretmana TP-om odnosno EDP-om pokazuje manje zastupljene interdigitacije ćelijske membrane, slabije razvijen gER i Goldži aparat, i smanjen broj mitohondrija u poređenju sa glavnim ćelijama Orx grupe životinja, što ukazuje na smanjenu sekretornu aktivnost glavnih ćelija paraštitastih žlezda. Sve ove histomorfometrijske i ultrastrukturne promene praćene su smanjenjem nivoa PTH u serumu nakon tretmana TP-om odnosno EDP-om što sugerše inhibitoran efekat polnih hormona na funkciju paraštitastih žlezda. Poznato je da su paraštitaste žlezde ciljni organi delovanja estrogena, ali je prisustvo ER u njihovim glavnim ćelijama i dalje kontroverzno pitanje (Naveh-Many i sar., 1992, Carrillo-Lopez i sar., 2009). Međutim, efekat estrogena na paraštitaste žlezde može biti ostvaren indirektno delovanjem FGF23 na sekretornu aktivnost glavnih ćelija paraštitastih žlezda koje proizvode PTH (Carrillo-Lopez i sar., 2009). Takođe, Carrillo-Lopez i saradnici (2009) su pokazali da je nivo FGF23 povećan nakon tretmana osteoblasta estradiolom u vremenski i dozno zavisnom maniru. Vezivanjem za receptorski kompleks FGFR1-Klotho, FGF23 ostvaruje inhibitoran efekat na sintezu i sekreciju PTH aktivirajući MAPK i ERK 1/2 signalne puteve (Ben-Dov i sar., 2007).

Kod Orx životinja tretiranih Vit D, volumen paraštitastih žlezda nije smanjen, ali je koncentracija PTH u serumu snižena u odnosu na Orx grupu. Takođe, ultrastrukturna analiza glavnih ćelija paraštitastih žlezda nakon tretmana Vit D pokazuje manje zastupljene interdigitacije ćelijske membrane, slabije razvijene sintetske organele gER i Goldži aparat, dok se u citoplazmi uočava manji broj mitohondrija. Inhibitorno delovanje na sintezu i sekreciju PTH Vit D može ostvariti direktnim vezivanjem za VDR u jedru glavnih ćelija paraštitastih žlezda (Silver i sar., 1986; Naveh-Many i sar.,

1990). Značajno povećanje koncentracije Ca^{2+} u serumu u ovim eksperimentalnim uslovima, nakon tretmana TP-om, EDP-om ili Vit D u poređenju sa Orx životinjama, može delovati inhibitorno na sekreciju PTH i u skladu je sa navodima Chu i saradnika (1973).

Volumen paraštitastih žlezda Orx pacova nakon tretmana genisteinom je značajno povećan, dok je tretman daidzeinom značajno smanjio volumen paraštitastih žlezda, u odnosu na Orx kontrolnu grupu životinja. Volumenske gustine glavnih ćelija su značajno smanjene, dok su volumenske gustine intersticijuma značajno povećane nakon aplikacije ovih izoflavona. Koncentracija PTH u serumu je značajno smanjena nakon tretmana izoflavonima, što pokazuje da je povećanje volumena paraštitastih žlezda posledica povećanja volumena nesekretorne faze žlezda. Ultrastrukturalna analiza je potvrdila očekivan nalaz uzrokovan inhibitornim delovanjem izoflavona. Naime, nakon tretmana genisteinom ili daidzeinom znatno manje su izražene interdigitacije ćelijske membrane, slabije je razvijen gER i Goldži kompleks, i prisutan je manji broj mitohondrija u citoplazmi, u odnosu na glavne ćelije kod Orx grupe. Obzirom na kontroverzno pitanje postojanja ER u glavnim ćelijama paraštitastih žlezda (Naveh-Many i sar., 1992, Carrillo-Lopez i sar., 2009) i na mogućnost njegovog odsustva, delovanje genisteina i daidzeina na sintezu i sekreciju PTH je verovatno posredovano mehanizmom nezavisnim od ER. Takođe, mehanizam delovanja genisteina i daidzeina na aktivnost glavnih ćelija paraštitastih žlezda može biti ostvaren i indirektnim putem. Vezivanje ovih izoflavona za ER u koštanom tkivu (Onoe i sar., 1997) može stimulisati sintezu i sekreciju FGF23, koji inhibira sintezu i sekreciju PTH (Ben-Dov i sar., 2007). Nakon tretmana genisteinom odnosno daidzeinom, povećana je koncentracija Ca^{2+} u serumu što dodatno može delovati inhibitorno na sekreciju PTH usled aktivacije CaSR

na membrani glavnih ćelija paraštitastih žlezda (Kifor i sar., 2001). Međutim, precizan mehanizam delovanja genisteina i daidzeina na strukturne i funkcionalne karakteristike glavnih ćelija paraštitastih žlezda u animalnom modelu andropauze nije u potpunosti razjašnjeno i ostaje predmet budućih istraživanja.

Tretman Orx životinja kalcijumom u našim eksperimentalnim uslovima značajno je smanjio volumen paraštitastih žlezda i volumensku gustinu glavnih ćelija, kao i koncentraciju PTH u serumu u odnosu na Orx pacove. Volumenska gustina intersticijuma nakon tretmana kalcijumom je značajno povećana u odnosu na Orx životinje, što dodatno snižava sekretorni potencijal glavnih ćelija paraštitastih žlezda. Ultrastruktorna analiza pokazuje manje izražene interdigitacije ćelijske membrane, slabije razvijeni gER i Goldži kompleks, i manji broj mitohondrija u poređenju sa glavnim ćelijama Orx grupe. Inhibitorski efekat tretmana kalcijumom na histomorfološke i ultrastrukturne karakteristike glavnih ćelija paraštitastih žlezda, zajedno sa očekivanim povećanjem koncentracije Ca^{2+} u serumu, može biti posledica aktivacije CaSR i stimulacije MAPK signalnog puta (Kifor i sar., 2001), što za posledicu ima snižavanje koncentracije PTH u serumu koje je pokazano u ovom istraživanju.

U skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja (Filipović i sar., 2007; 2010), Orx je u ovom eksperimentu uzrokovala značajno smanjenje koncentracija Ca^{2+} i Pi u serumu što je praćeno značajnim povećanjem koncentracija Ca^{2+} i Pi u urinu, u odnosu na lažno operisanu kontrolnu grupu. Objavljeni rezultati ovih istraživanja prvi put pokazuju da nedostatak polnih hormona izazavan Orx-om deluje inhibitorski na ekspresiju gena za NaPi 2a kotransporter na pokrovnoj ivici epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega, što za posledicu ima povećanje koncentracije Pi u urinu u poređenju sa kontrolnom grupom pacova (Pantelić i sar., 2013). Kod Orx životinja je

uočeno značajno povećanje intenziteta imunofluorescentnog signala za PTH1R u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega u odnosu na lažno operisanu kontrolnu grupu. Poznato je da PTH vezivanjem za PTH1R ostvaruje inhibitoran uticaj na ekspresiju NaPi 2a kotransportera (Kempson i sar., 1995; Bacic i sar., 2006). U prilog smanjenoj ekspresiji NaPi 2a kotransportera je i povećana koncentracija PTH nakon Orx, koja je detektovana u ovom istraživanju. Josifovska i saradnici (2003) su pokazali da PTH ima stimulatorni uticaj na ekspresiju PTH1R u tubulima bubrega. Inhibitorna uloga FGF23 na ekspresiju NaPi 2a kotransportera dokumentovana je brojnim studijama (Gatteneni i sar., 2009; Razzaque, 2009; Farrow i sar., 2009). Međutim, postoji mogućnost da je nedostatak polnih hormona kod Orx životinja snizio koncentraciju FGF23 (Carrillo-Lopez i sar., 2009), pa bi snižena ekspresija NaPi 2a kotransportera mogla biti posledica inhibicije od strane PTH. Takođe, u prilog ovoj pretpostavci je i nepromenjen intenzitet imunoreaktivnosti i nivo ekspresije iRNK za FGFR i Klotho receptor u tubulima bubrega Orx pacova u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Povećana koncentracija Ca^{2+} u urinu kod Orx životinja može biti posledica izostanka pozitivnog efekta sekretorne forme Klotho proteina na aktivnost TRPV5 i reapsorpciju Ca^{2+} iz urina.

Intenzitet imunofluorescence obeleženog NaPi 2a kotransportera kao i nivo ekspresije njegove iRNK su pojačani nakon tretmana TP-om i Vit D, dok je signal imunofluorescentno obeleženog PTH1R smanjen, u odnosu na Orx životinje. Povećan stepen ekspresije NaPi 2a kotransportera na apikalnoj membrani epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega, nakon tretmana TP-om, doprineo je povećanju koncentracije Pi u serumu, u poređenju sa serumom Orx pacova. Smanjenje koncentracije PTH, kao i smanjenje intenziteta imunofluorescence za PTH1R, nakon

tretmana Vit D, može doprineti povećanoj ekspresiji NaPi 2a kotransportera i smanjenoj koncentraciji Pi u urinu, u odnosu na iste parametre kod Orx grupe. Zastupljenost imunoobeleženog FGFR receptora i nivoi iRNK za ovaj receptor su smanjeni nakon tretmana Vit D, što dovodi do izostanka inhibitornog dejstva FGF23 na aktivnost NaPi 2a kotransportera. Posledica toga može biti smanjenje koncentracije Pi u urinu koje je zabeleženo nakon tretmana Vit D. Tretman EDP-om značajno je smanjio kako intenzitet imunofluorescentno obeleženog signala, tako i nivo ekspresije iRNK za NaPi 2a, dok je prisustvo PTH1R neznatno smanjeno, što je zajedno doprinelo povećanju koncentracije Pi u urinu. Mehanizam delovanja EDP na regulaciju ekspresije i aktivnosti NaPi 2a kotransportera nije poznat. Studija Faroqui i saradnika (2008) pokazuju da inhibitoran efekat tretmana EDP-om na NaPi 2a ekspresiju i aktivnost nije posredovana preko ER α . Neznatno promenjena zastupljenost PTH1R u epitelnim ćelija proksimalnih tubula bubrega, u odnosu na Orx grupu, omogućava veći stepen inhibitornog delovanja PTH na ekspresiju NaPi 2a kotransportera, što rezultuje povećanom koncentracijom Pi u urinu, detektovanom nakon EDP tretmana. Takođe, značajno povećanje intenziteta imunoreaktivnosti za FGFR i Klotho receptora kao i nivoa iRNK ovih receptora koji su uočeni nakon tretmana EDP-om, omogućavaju potentan inhibitoran efekat FGF23 na aktivnost NaPi 2a kotransportera. Carrillo-Lopez i saradnici (2009) su u *in vitro* studiji pokazali da estradiol deluje stimulatorno na sintezu i sekreciju FGF23 od strane osteoblasta, kao i da FGF23 ima stimulatoran efekat na ekspresiju iRNK za Klotho, za koji pretpostavljaju da maskira ili izjednačava efekat estrogena.

Nakon tretmana izoflavonima intenzitet imunofluorescentnog signala i nivo ekspresije iRNK za NaPi 2a kotransporter, su značajno povećani u odnosu na Orx grupu životinja. Povećana ekspresija i prisustvo NaPi 2a kotransportera na apikalnoj

membrani epitelnih ćelija proksimalnih tubula, nakon tretmana genisteinom i daidzeinom je značajno smanjila koncentraciju Pi u urinu i povećala njegovu koncentraciju u serumu, u poređenju sa Orx životinjama. Naši rezultati sugerišu da je povećana ekspresija NaPi 2a kotransportera nakon tretmana genisteinom i daidzeinom verovatno posledica redukovane inhibicije od strane PTH, budući da je njegova koncentracija u serumu, nakon tretmana izoflavonima snižena. Takođe, zastupljenost imunofluorescentno obeleženog PTH1R nakon tretmana izoflavonima je značajno smanjena u poređenju sa Orx grupom. Kao što je već napomenuto, PTH i FGF23 deluju inhibitorno na ekspresiju NaPi 2a kotransportera i svoj efekat ostvaruju aktivacijom ERK1/2 signalnog puta (Yamashita i sar., 2002; Bacic i sar., 2003). Nesumnjiva inhibitorna uloga genisteina u regulaciji tirozin kinaza (Akiyama i sar., 1987; Yan i sar., 2011) sugeriše njegovo moguće delovanje na aktivaciju ERK1/2 signalnog puta i inhibiciju izlučivanja Pi urinom, uzrokovanih PTH-om i FGF23. Pored toga, rezultati ovog istraživanja pokazuju da su intenzitet imunoreaktivnosti i ekspresija iRNK za FGFR smanjeni nakon tretmana izoflavonima. Sa druge strane intenzitet obojenosti i nivo ekspresije iRNK za Klotho receptor su značajno povećani nakon tretmana genisteinom, odnosno smanjeni nakon tretmana daidzeinom, u poređenju sa Orx pacovima. Precizni mehanizam delovanja genisteina i daidzeina na ekspresiju funkcionalno zavisnog receptorskog kompleksa nisu rasvetljeni i trebalo bi da budu predmet budućih istraživanja. Utvrđeno je da glukokortikoidi imaju inhibitoran efekat na ekspresiju NaPi 2a kotransportera (Levi i sar., 1995). Međutim, studije Ajdžanović i saradnika (2009a; 2009b; 2011) dokumentuju da je koncentracija kortikosterona kod Orx pacova smanjena nakon aplikacije genisteina ili daidzeina. Izostanak inhibitornog delovanja glukokortikoida nakon tretmana izoflavonima može doprineti povećanju ekspresije

NaPi 2a kotransportera na četkastoj pokrovnoj membrani. Pored toga, mogući mehanizam delovanja izoflavona mogao bi biti i preko ER. Kao što je već pomenuto Faroqui i saradnici (2008) su pokazali da estradiol ima inhibitoran efekat na ekspresiju NaPi 2a kotransporter, ali da taj efekat nije regulisan interakcijom sa ER α . Kod Orx pacova ekspresija ER β je značajno povećana, dok je nivo ekspresije ER α nepromenjen (Rogers i sar., 2007). Genistein i daidzein imaju veći afinitet vezivanja za ER β (Kuiper i sar., 1997) što navodi na pretpostavku da bi navedeni izoflavoni mogli delovati na regulaciju ekspresije NaPi 2a kotransportera posredstvom vezivanja za ER β . U svakom slučaju neophodne su dodatne studije koje bi rasvetlile tačan mehanizam delovanja genisteina i daidzeina na regulaciju ekspresije NaPi 2a kotransportera na apikalnoj membrani epitelnih ćelija proksimalnih tubula.

Tretman Orx pacova kalcijumom u našim eksperimentalnim uslovima uzrokovao je značajno povećanje koncentracije Pi u serumu, kao posledicu povećane reapsorpcije Pi u urinu, zajedno sa blagim povećanjem imunofluorescentnog signala i nivoa iRNK za NaPi 2a u odnosu na Orx pacove. S obzirom da je koncentracija PTH snižena nakon tretmana kalcijumom, povećana ekspresija NaPi 2a kotransportera je verovatno rezultat smanjene inhibicije od strane PTH. U prilog ovoj pretpostavci je i smanjen signal imunofluorescentno obeleženog PTH1R koji je detektovan nakon tretmana kalcijumom. Povećana koncentracija Ca²⁺ u serumu nakon tretmana kalcijumom, može aktivirati CaSR u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula i neposredno poništiti PTH-om izazvan inhibitorski efekat na ekspresiju NaPi 2a kotransportera (Ba i sar., 2003). Intenzitet obojenosti i nivo iRNK i za FGFR i Klotho receptore pokazuju sličan stepen sniženja nakon tretmana kalcijumom u odnosu na Orx životinje. Izostanak inhibitorskog delovanja FGF23 na ekspresiju NaPi 2a kotransportera takođe može biti jedan od

razloga smanjene koncentracije Pi u urinu pacova tretiranih kalcijumom. Mehanizam delovanja kalcijuma na ekspresiju FGFR i Klotho receptora za sada nije poznat.

Koncentracija Ca^{2+} u urinu nakon Orx u našim eksperimentalnim uslovima značajno je povećana u odnosu na lažno operisanu kontrolnu grupu životinja i u saglasnosti je sa prethodnim literaturnim podacima (Filipović i sar., 2007; 2010; 2013). Intenzitet imunoreaktivnosti kao i nivo ekspresije iRNK za Klotho receptor nakon Orx nisu značajno promenjeni u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Nedostatak polnih hormona, koji imaju stimulatorni efekat na TRPV5 (Prince, 1995; Van Abel i sar., 2002), kao i nepromenjeni intenzitet imunoreaktivnosti i ekspresije gena za Klotho receptor sugerišu inhibitorni uticaj Orx na TRPV5 i izostanak glukuronidazne aktivnosti sekretovanog Klotho proteina.

Tretmani TP-om ili Vit D su značajno smanjili koncentraciju Ca^{2+} u urinu, ali navedeni tretmani nisu uzrokovali značajne promene u intenzitetu obojenosti i ekspresiji gena za Klotho receptor u poređenju sa Orx pacovima. Nakon tretmana EDP-om, intenzitet imunoreaktivnosti i nivo iRNK za Klotho receptor značajno su povećani u odnosu na Orx životinje. Usled pozitivnog efekta polnih hormona na aktivnost TRPV5, smanjenje koncentracije Ca^{2+} u urinu je očekivano što naši rezultati potvrđuju. Takođe, povećani intenzitet imunoobeleženog Klotho proteina i ekspresija iRNK za ovaj receptor nakon tretmana EDP-om stimulatorno deluje na aktivnost TRPV5 i reapsorciju Ca^{2+} iz urina.

Nakon tretmana genisteinom, stepen obojenosti i nivo iRNK Klotho receptora su značajno povećani u poređenju sa Orx životinjama, što je praćeno smanjenjem koncentracije Ca^{2+} u urinu. Estrogenski efekat koji ispoljava genistein (Kuiper i sar., 1997) može biti jedan od razloga njegovog stimulatornog uticaja na ekspresiju iRNK za

Klotho receptor. Snižena koncentracija Ca^{2+} u urinu nakon tretmana genisteinom, može biti posledica glukuronidazne aktivnost Klotho proteina i povećane aktivnosti TRPV5 (Chang i sar., 2005). Tretman daidzeinom je značajno smanjio intenzitet imunoreaktivnosti i nivo iRNK za Klotho receptor, u odnosu na Orx grupu, iako je koncentracija Ca^{2+} u urinu snižena. Snižena koncentracija Ca^{2+} u urinu nakon tretmana daidzeinom u skladu je sa novijim literaturnim podacima (Filipović i sar., 2010) i mogla bi biti posledica estrogenskog delovanju daidzeina, a samim tim i stimulacije aktivnosti TRPV5 i reapsorpciji Ca^{2+} iz urina (Van Abel i sar 2002). U prilog ovome je i dokaz o povećanoj zastupljenosti $\text{ER}\beta$ u bubregu pacova nakon Orx (Rogers i sar., 2007), za koji se daidzein vezuje sa većim afinitetom u odnosu na $\text{ER}\alpha$ (Kuiper i sar., 1997). Buduća istraživanja mehanizama delovanja izoflavona na regulaciju homeostaze Ca^{2+} i Pi kao i identifikacija ostalih fizioloških signala koji utiču na ovaj proces su neophodna radi boljeg razumevanja mehanizama odgovornih za koordinaciju homeostaze i metabolizma Ca^{2+} i Pi.

Intenzitet obojenosti i nivo iRNK za Klotho receptor nakon tretmana kalcijumom nije značajno promenjen nakon Orx, dok je koncentracija Ca^{2+} u urinu značajno snižena u poređenju sa Orx životinjama. Budući da je koncentracija PTH snižena nakon tretmana kalcijumom, a ekspresija gena i Klotho proteina nepromenjena, moguće da je smanjen stimulatorni efekat PTH i sekretorne forme Klotho proteina na aktivnost TRPV5. Pored toga, povećanje stepena pasivnog transporta Ca^{2+} između epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega može biti jedno od objašnjenje dobijenih rezultata. Precizan mehanizam delovanja biće predmet naših budućih studija.

6. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata, a u skladu sa postavljenim ciljem i konkretnim zadacima istraživanja moguće je izvesti sledeće zaključke:

- nedostatak polnih hormona, nakon Orx, stimulisao je porast volumena paraštitastih žlezda, a detektovane ultrastrukturne promene glavnih ćelija ovih žlezda znak su njihove pojačane sintetske aktivnosti što je praćeno povećanjem sekrecije i nivoa PTH u serumu u odnosu na kontrolne vrednosti;

- hronični tretmani Orx životinja TP-om ili EDP-om su značajno smanjili volumen paraštitastih žlezda, a inhibitorne promene na ultrastrukturnom nivou glavnih ćelija i smanjenje koncentracije PTH u serumu, svedoče o inhibiciji sinteze i sekrecije ovog hormona u poređenju sa aktivnošću glavnih ćelija kod kontrolnih Orx životinja;

- hronični tretman Orx životinja genisteinom značajno je povećao volumen paraštitastih žlezda u kojima je izražena proliferacija vezivnog tkiva, dok je tretman daidzeinom smanjio volumen paraštitastih žlezda. Volumen glavnih ćelija značajno je smanjen dok je volumen intersticijuma značajno povećan nakon tretmana genistinom ili dadizeinom u odnosu na kontrolne Orx životinje. Analiza ultrastrukturnih karakteristika glavnih ćelija paraštitastih žlezda ukazuje na inhibitorski efekat tretmana izoflavonima na njihovu sintezu i sekreciju pa je nivo PTH u serumu značajno snižen u poređenju sa kontrolnim vrednostima;

- hronični tretman Orx životinja kalcijumom značajno je smanjio volumen paraštitastih žlezda, inhibirao sintetsku i sekretornu aktivnost glavnih ćelija i snizio koncentraciju PTH u serumu, u poređenju sa kontrolnim Orx životinjama;

- nedostatak polnih hormona nakon Orx, uzrokovao je značajno smanjenje intenziteta imunofluorescentno obeleženog NaPi 2a kotransportera i pojačanje intenziteta

obeležnog PTH1R u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega u poređenju sa kontrolnim vrednostima;

- hronični tretmani Orx životinja TP-om ili Vit D uzrokovali su značajno povećanje zastupljenosti i ekspresije NaPi 2a kotransportera i smanjeno prisustvo PTH1 receptora, u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Jačina imunoreaktivnosti i stepen ekspresije za FGF receptor značajno su smanjeni nakon tretmana Vit D, dok je tretman EDP-om delovao inhibitorno na zastupljenost i ekspresiju NaPi 2a kotransportera, odnosno stimulatorno na jačinu imunoreaktivnosti i stepen ekspresije FGF i Klotho receptora;

- hronični tretmani Orx životinja izoflavonima, značajno su povećali intenzitet imunofluorescentno obeležnog NaPi 2a kotransportera kao i nivo iRNK za NaPi 2a, i smanjili zastupljenost PTH1 receptora, u odnosu na kontrolne vrednosti. Ovi tretmani su smanjili zastupljenost i nivo iRNK za FGF, u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Jačina imunoreaktivnosti i stepen ekspresije za Klotho receptor su povećani nakon tretmana genisteinom, odnosno smanjeni nakon tretmana daidzeinom;

- hronični tretman Orx životinja kalcijumom smanjio je zastupljenost PTH1 i FGF receptora u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula u poređenju sa kontrolnim vrednostima;

- nedostatak polnih hormona, nakon Orx, značajno je smanjio koncentracije Ca^{2+} i Pi u serumu, odnosno povećao koncentracije Ca^{2+} i Pi u urinu, u poređenju sa kontrolnim vrednostima;

- nakon hroničnih tretmana TP-om, EDP-om ili Vit D koncentracije Ca^{2+} u serumu su povećane, dok je tretman TP-om uzrokovao i povećanje koncentracije Pi u serumu, u odnosu na iste parametre kod Orx pacova. Koncentracija Ca^{2+} u urinu značajno je smanjena nakon tretmana TP-om, EDP-om ili Vit D, dok je koncentracija Pi u urinu

značajno povećana nakon tretmana EDP-om a smanjena nakon tretmana sa Vit D u odnosu na kontrolne vrednosti;

- hronični tretmani genisteinom ili daidzeinom značajno su povećali koncentracije Ca^{2+} i Pi u serumu i uzrokovali značajno smanjenje koncentracija Ca^{2+} i Pi u urinu, u poređenju sa kontrolnim vrednostima;

- hronični tretman kalcijumom značajno je povećao koncentracije Ca^{2+} i Pi u serumu, dok su koncentracije Ca^{2+} i Pi u urinu značajno smanjene nakon ovog tretmana, u odnosu na njihove vrednosti kod Orx pacova.

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem efekata steroida, izoflavona i kalcijuma u animalnom modelu andropauze utvrđene su izvesne razlike u dejstvima istog smera konvencionalnih i alternativnih terapijskih pristupa na homeostazu Ca^{2+} i Pi. Naime, u poređenju sa tretmanima steroidnim hormonima i kalcijumom, tretmani izoflavonima ispoljavaju jači stimulatoran efekat na ekspresiju NaPi 2a kotransportera, značajnije snižavaju stepen zastupljenosti PTH1R, prisustvo i ekspresija FGFR u tubulima bubrega je izraženije smanjena, imaju intenzivniji efekat na smanjenje koncentracija Ca^{2+} i Pi u urinu, odnosno na povećanje koncentracija Ca^{2+} i Pi u serumu. Sve navedene promene mogu pozitivno regulisati homeostazu koja je narušena procesom starenja.

7. Reference

- Aalinkeel R, Hu Z, Nair BB, Sykes DE, Reynolds JL, Mahajan SD, et al. Genomic analysis highlights the role of the JAK-STAT signaling in the anti-proliferative effects of dietary flavonoid-'Ashwagandha' in prostate cancer cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine/eCAM* 7:177-187, 2010.
- Adami S, Gatti D, Bertoldo F, Rossini M, Fratta-Pasini A, Zamberlan N, et al. The effects of menopause and estrogen replacement therapy on the renal handling of calcium. *Osteoporos Int* 2:180-185, 1992.
- Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western Diseases. *Annals of Medicine* 29:95-120, 1997.
- Ajdzanovic V, Sosic-Jurjevic B, Filipovic B, Trifunovic S, Manojlovic-Stojanoski M, Sekulic M, et al. Genistein induced histomorphometric and hormone secreting changes in the adrenal cortex in middle-aged rats. *Exp Biol Med* 234:148-156, 2009b.
- Ajdzanovic V, Sosic-Jurjevic B, Filipovic B, Trifunović S, Brkić DD, Sekulić M, et al. Genistein affects the morphology of pituitary ACTH cells and decreases circulating levels of ACTH and corticosterone in middle-aged male rats. *Biol Res* 42: 13-23, 2009a.
- Ajdzanović V, Spasojević I, Filipović B, Šošić-Jurjević B, Sekulić M, Milošević V. Effects of genistein and daidzein on erythrocyte membrane fluidity: an electron paramagnetic resonance study. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88:497-500, 2010.
- Ajdzanović VZ, Šošić-Jurjević BT, Filipović BR, Trifunović SL, Milošević VLj. Daidzein effects on ACTH cells: immunohistomorphometric and hormonal study in an animal model of the andropause. *Histol Histopathol* 26:1257-1264, 2011.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine specific protein kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5595, 1987.
- Andres S, Abraham K, Appel KE, Lampen A. Risks and benefits of dietary isoflavones for cancer. *Critical Reviews in Toxicology* 41:463-506, 2011.
- Arnaud CD, Sanchez SD. The role of calcium in osteoporosis. *Annu Rev Nutr* 10:397-414, 1990.
- Arora A, Byrem TM, Nair MG, Strasburg GM. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373:102-109, 2000.

- Azios NG, Dharmawardhane SF. Role of soy phytoestrogens genistein and daidzein in focal adhesion assembly and focal adhesion kinase activity in breast cancer cells. In J.J. Li, S.A. Li, & A. Llombart-Bosch (Eds.), *Hormonal carcinogenesis IV*. New York, USA: Springer Science+Business Media Inc 300-308, 2005.
- Ba J, Brown D, Friedman PA. Calcium-sensing receptor regulation of PTH-inhibitable proximal tubule phosphate transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:1233-1243, 2003.
- Bacic D, LeHir M, Biber J, Kaissling B, Murer H, Wagner CA. The renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone. *Kidney International* 69:495-503, 2006.
- Bacic D, Schulz N, Biber J, Kaissling B, Murer H, Wagner CA. Involvement of the MAPK-kinase pathway in the PTH mediated regulation of the proximal tubule type IIa Na⁺/Pi cotransporter in mouse kidney. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 446:52-60, 2003.
- Banerjee S, Li YW, Wang ZW, Sarkar FH. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett* 269:226-242, 2008.
- Banerjee S, Zhang YX, Ali S, Bhuiyan M, Wang ZW, Chiao PJ, et al. Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine by genistein in vitro and in vivo using an orthotopic model of pancreatic cancer. *Cancer Res* 65:9064-72, 2005.
- Barnes S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic Research and Biology* 8:89-98, 2010.
- Bassil N, Alkaade S, eMorley J. The benefits and risks of testosterone replacement therapy: a review. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 5:427-448, 2009.
- Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83:851-7, 1995.
- Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-344, 1989.
- Beck V, Rohr U, Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 94:499-518, 2005.
- Bell O, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroid Hormone, from Gene to Protein. *Molecular biology of the parathyroid*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 233 Spring Street, New York, New York, USA, 2005.

- Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 117:4003-4008, 2007.
- Bennett N, Hooper JD, Lee CS, Gobe GC. Androgen receptor and caveolin-1 in prostate cancer. *IUBMB Life* 61:961-70, 2009.
- Biber J, Hernando N, Forster I, Murer H. Regulation of phosphate transport in proximal tubules. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 458: 39-52, 2009.
- Biber J, Hernando N, Forster I. Phosphate Transporters and Their Function. *Annu Rev Physiol* 75:535-550, 2013.
- Bilezikian JP, Morishima A, Bell J, Grumbach MM. Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 339:599-603, 1998.
- Borras C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE, Vina J. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NF κ B. *FASEB J* 20:E1476-E1481, 2006.
- Bourdeau A, Moutahir M, Souberbielle JC, Bonnet P, Herviaux P, Sachs C, et al. Effects of lipoxygenase products of arachidonate metabolism on parathyroid hormone secretion. *Endocrinology* 135:1109-1112, 1994.
- Bourdeau A, Souberbielle JC, Bonnet P, Herviaux P, Sachs C, Lieberherr M. Phospholipase-A2 action and arachidonic acid in calcium-mediated parathyroid hormone secretion. *Endocrinology* 130:1339-1344, 1992.
- Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, Slatopolsky E. The roles of calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the regulation of vitamin D receptor expression by rat parathyroid glands. *Endocrinology* 136:1419-1425, 1995.
- Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O. Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366:575-80, 1993.
- Brown EM, Vassilev PM, Quinn S, and Hebert SC. G protein-coupled, extracellular Ca²⁺-sensing receptor: a versatile regulator of diverse cellular functions. *Vitam Horm* 55:1-71, 1999.
- Brown EM. Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev* 71:371-411, 1991.

- Brown EM. in *The Parathyroids: Basic and Clinical Concepts* (Academic, San Diego), 167-181, 2001.
- Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem* 277:30337-30350, 2002.
- Canalejo R, Canalejo A, Martinez-Moreno JM, Rodriguez-Ortiz ME, Estepa JC, Mendoza FJ, et al. FGF23 Fails to Inhibit Uremic Parathyroid Glands. *J Am Soc Nephrol* 21:1125-1135, 2010.
- Carrillo-Lopez N, Roman-Garcia P, Rodriguez-Rebollar A, Fernandez-Martin JL, Naves-Diaz M, Cannata-Andia JB. Indirect regulation of PTH by estrogens may require FGF23. *J Am Soc Nephrol* 20:2009-2017, 2009.
- Casini ML, Marelli G, Papaleo E, Ferrari A, D'Ambrosio F, Unfer V. Psychological assessment of the effects of treatment with phytoestrogens on postmenopausal women: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled study. *Fertility and Sterility* 85:972-978, 2006.
- Castelo-Branco C, Martinez de Osaba MJ, Pons F, Gonzales-Merlo J. The effect of hormone replacement therapy on postmenopausal bone loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 44:131-136, 1992.
- Cha SK, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro-o M, Huang CL. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *PNAS* 105:9805-9810, 2008.
- Chahal HS, Drake WM. The endocrine system and aging. *J Pathol* 211:173-180, 2007.
- Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 310:490-493, 2005.
- Chen JW, Zhu ZQ, Hu TX, Zhu DY. Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl-radical scavenging effects. *Acta Pharmacologica Sinica* 23:667-672, 2002.
- Choi EJ. Evaluation of equol function on anti- or prooxidant status in vivo. *J Food Sci* 74:H65-71, 2009.

- Chu LL, MacGregor RR, Anast CS, Hamilton JW, Cohn DV. Studies on the biosynthesis of rat parathyroid hormone and parathyroid hormone: adaptation of the parathyroid gland to dietary restriction of calcium. *Endocrinology* 93: 915-924, 1973.
- Clarkson TB, Anthony MS, Morgan TM. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 86:41-47, 2001.
- Coleman R, Silbermann M. Ultrastructure of parathyroid glands in triamcinolone-treated mice. *J Anat* 126:181-192, 1978.
- Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20:358-417, 1999.
- Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *Journal of Biological Chemistry* 272:19858-19862, 1997.
- Divi RL, Chang HC, Doerge DR. Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochemical Pharmacology* 54:1087-1096, 1997.
- Dixon RA, Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry* 60:205-211, 2002.
- Duluc L, Soletti R, Clere N, Andriantsitohaina R, Simard G. Mitochondria as potential targets of flavonoids: focus on adipocytes and endothelial cells. *Current Medicinal Chemistry* 19:4462-4474, 2012.
- El Touny LH, Banerjee PP. Identification of a biphasic role for genistein in the regulation of prostate cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 69:3695-3703, 2009.
- Faroqui S, Levi M, Soleimani M, Amlal H. Estrogen downregulates the proximal tubule type IIa sodium phosphate cotransporter causing phosphate wasting and hypophosphatemia. *Kidney Int* 73:1141-1150, 2008.
- Farrow EG, Davis SI, Summers LJ, White KE. Initial FGF23-mediated signaling occurs in the distal convoluted tubule. *J Am Soc Nephrol* 20:955-960, 2009.
- Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16:8, 2005.
- Filipović B, Sošić-Jurjević B, Ajdžanović V, Pantelić J, Nestorović N, Milošević V, et al. The effects of sex steroids on thyroid C cells and trabecular bone structure in the rat model of male osteoporosis. *J Anat* 222:313-20, 2013.

- Filipović B, Šošić-Jurjević B, Ajdžanović V, Brkić D, Manojlović-Stojanoski M, Milošević V, et al. Daidzein administration positively affects thyroid C cells and bone structure in orchidectomized middle-aged rats. *Osteoporosis Int* 2:1609-1616, 2010.
- Filipović B, Šošić-Jurjević B, Ajdžanović V, Trifunović S, Manojlović-Stojanoski M, Ristić N, et al. The effect of orchidectomy on thyroid C cells and bone histomorphometry in middle-aged rats. *Histochem Cell Biol* 128:153-159, 2007.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6965-6970, 1998.
- Freeman MR, Cinar B, Lu ML. Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab* 16:273-279, 2005.
- Galitzer H, Ben-Dov I, Lavi-Moshayoff V, Naveh-Many T, Silver J. Fibroblast growth factor 23 acts on the parathyroid to decrease parathyroid hormone secretion. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 17:363-367, 2008.
- Gallagher JC, Goldgar D. Treatment of post-menopausal osteoporosis with high doses of synthetic calcitriol. A randomized controlled study. *Ann Intern Med* 113:649-655, 1990.
- Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, et al. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia *in vivo* predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F282-F291, 2009.
- Geller JL, Adams JS. Vitamin D therapy. *Current Osteoporosis Reports* 6:5-11, 2008.
- Gennari C. Calcium and vitamin D nutrition and bone disease of the elderly. *Public Health Nutrition* 4:547-59, 2001.
- Gill RK, Turner RT, Wronski TJ, Bell NH. Orchiectomy markedly reduces the concentration of the three isoforms of transforming growth factor β in rat bone, and reduction is prevented by testosterone. *Endocrinology* 139:546-550, 1998.
- Gong L, Li Y, Nedeljkovic-Kurepa A, Sarkar FH. Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene* 22:4702-9, 2003.
- Grodstein F, Colditz GA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone use and cholecystectomy in a large prospective study. *Obstet Gynecol* 83: 5-11, 1994.

- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy* 147: 229-63, 1987.
- Gunther T, Chen ZF, Kim J, Priemel M, Rueger JM, Amling M, et al. Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone. *Nature* 406, 199-203, 2000.
- Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, et al. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16:2205-2215, 2005.
- Gwin J, Drews N, Ali S, Stamschror J, Sorenson M, Rajah TT. Effect of genistein on p90RSK phosphorylation and cell proliferation in T47D breast cancer cells. *Anticancer Res* 31:209-214, 2011.
- Habener JF, Potts JT Jr. Fundamental considerations in the physiology, biology, and biochemistry of parathyroid hormone. In: *Metabolic Bone Disease*, edited by Avioli LV and Krane SM. Philadelphia, PA: Saunders, 69–130, 1990.
- Habener JF. Regulation of parathyroid hormone secretion and biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 43:211-223, 1981.
- Halloran B, Uden P, Duh QY, Kikuchi S, Wieder T, Cao J, et al. Parathyroid gland volume increases with postmaturational aging in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E557-E563, 2002.
- Harada N, Utsumi T, Takagi Y. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11312-11316, 1993.
- Healy KD, Vanhooke JL, Prah JM, DeLuca HF. Parathyroid hormone decreases renal vitamin D receptor expression in vivo. *PNAS* 102:4724-4728, 2005.
- Hebert SC, Brown EM, Harris HW. Role of the Ca²⁺-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *J Exp Biol* 200:295-302, 1997.
- Hirvonen J, Rajalin AM, Wohlfahrt G, Adlercreutz H, Wähälä K, Aarnisalo P. (2011). Transcriptional activity of estrogen-related receptor γ (ERR γ) is stimulated by the phytoestrogen equol. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 123:46-57, 2011.

- Hjalm G, MacLeod RJ, Kifor O, Chattopadhyay N, Brown EM. Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 276:34880-34887, 2001.
- Hoenderop JG, Dardenne O, Van Abel M, Van Der Kemp AW, Van Os CH, St-Arnaud R, et al. Modulation of renal Ca^{2+} transport protein genes by dietary Ca^{2+} and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase knockout mice. *FASEB J* 16:1398-1406, 2002.
- Hoenderop JG, Nilius B, and Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85:373-422, 2005.
- Hu CM, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J* 24:3438-3450, 2010.
- Huang CL, Moe OW. Klotho: a novel regulator of calcium and phosphorus homeostasis. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 462:185-193, 2011.
- Huang X, Chen S, Xu L, Liu Y, Deb DK, Plataniias LC, et al. Genistein inhibits p38 map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. *Cancer Research* 65:3470-3478, 2005.
- Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, et al. Secreted Klotho protein in sera and CSF: Implication for posttranslational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett* 565:143-147, 2004.
- Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, et al. Alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* 316:1615-1618, 2007.
- Ishimi Y, Yoshida M, Wakimoto S, Wu J, Chiba H, Wang X, et al. Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. *Bone* 31:180-185, 2002.
- Jamadar-Shroff V, Papich MG, Suter SE. Soy-derived isoflavones inhibit the growth of canine lymphoid cell lines. *Clin Cancer Res* 15:1269-1276, 2009.
- Josifovska T, Nonoguchi H, Machida K, Tomita K. Mechanisms of down-regulation of the renal parathyroid hormone receptor in rats with chronic renal failure. *Nephron Exp Nephrol* 93:141-149, 2003.

- Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology, Text&Atlas 11th edition. Publisher MsGraw-Hill. 2005.
- Kalaiselvan V, Kalaivani M, Vijayakumar A, Sureshkumar K, Venkateskumar K. Current knowledge and future direction of research on soy isoflavones as a therapeutic agents. *Pharmacognosy Reviews* 4:111-117, 2010.
- Kang NJ, Lee KW, Rogozin EA, Cho YY, Heo YS, Bode AM, et al. Equol, a metabolite of the soybean isoflavone daidzein, inhibits neoplastic cell transformation by targeting the MEK/ERK/p90RSK/activator protein-1 pathway. *J Biol Chem* 282:32856-32866, 2007.
- Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev* 26:833-876, 2005.
- Ke HZ, Crawford DT, Qi H, Chidsey-Frink KL, Simmons HA, Li M, et al. Long-term effects of aging and orchidectomy on bone and body composition in rapidly growing male rats. *J Musculoskel Neuron Interact* 1:215-224, 2001.
- Kempson SA, Lötscher M, Kaissling B, Biber J, Murer H, Levi M. Parathyroid hormone action on phosphate transporter mRNA and protein in rat renal proximal tubules. *American Journal of Physiology* 268:F784-F791, 1995.
- Keusch I, Traebert M, Lotscher M, Kaissling B, Murer H, Biber J. Parathyroid hormone and dietary phosphate provoke a lysosomal routing of the proximal tubular Na/Pi-cotransporter type II. *Kidney Int* 54:1224-1232, 1998.
- Khosla S, Atkinson EJ, Melton LJ III, Riggs BL. Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: A population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1522-1527, 1997.
- Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, et al. Regulation of MAP kinase by calciumsensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK-293 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F291-F302, 2001.
- Kim J, Jones BW, Zock C, Chen Z, Wang H, Goodman CS, et al. Isolation and characterization of mammalian homologs of the *Drosophila* gene *glial cells missing*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12364-12369, 1998.
- Kang JS, Yoon YD, Han SB, Lee K, Park SK, Kim HM. Equol inhibits nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression through down-regulating the activation of Akt. *Int Immunopharmacol* 7:491-499, 2007.

- Koide A, Zhao C, Naganuma M, Abrams J, Deighton-Collins S, Skafar DF, et al. Identification of regions within the F domain of the human estrogen receptor alpha that are important for modulating transactivation and protein-protein interactions. *Molecular Endocrinology* 21:829-842, 2007.
- Kruk I, Aboul-Enein HY, Michalska T, Lichszteid K, Kladna A. Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence* 20:81-89, 2005.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870, 1997.
- Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64:310-319, 1999.
- Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, et al. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids*. 2011:812540, 2011.
- Kurnik BRC, Hruska KA. Effects of 1–25 dihydroxycholecalciferol on phosphate transport in vitamin D-deprived rats. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 247: F177-F184, 1984.
- Kurnik BRC, Hruska KA. Mechanism of stimulation of renal phosphate transport by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Biochim Biophys Acta* 817:42-50, 1985.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45–51, 1997.
- Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 309:1829-1833, 2005.
- Lamont KR, Tindall DJ. Minireview: alternative activation pathways for the androgen receptor in prostate cancer. *Mol Endocrinology* 25:897-907, 2011.
- Lang PO, Samaras D, Samaras N. Testosterone replacement therapy in reversing. “Andropause”: What is the proof-of-principle? *Rejuvenation Res* 15:453-65, 2012.
- Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Juppner H, Jonsson KB: Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int* 64:2272-2279, 2003.

- Levi M, Lötscher M, Sorribas V, Custer M, Arar M, Kaissling B, et al. Cellular mechanisms of acute and chronic adaptation of rat renal P(i) transporter to alterations in dietary P(i). *Am J Physiol* 267:F900-F908, 1994.
- Levi M, Shayman JA, Abe A, Gross SK, McCluer RH, Biber J, et al. Dexamethasone modulates rat renal brush border membrane phosphate transporter mRNA and protein abundance and glycosphingolipid composition. *Journal of Clinical Investigation* 96:207-216, 1995.
- Li M, Zhang Z, Hill DL, Chen X, Wang H, Zhang R. Genistein, a dietary isoflavone, down-regulates the MDM2 oncogene at both transcriptional and posttranslational levels. *Cancer Res* 65:8200-8208, 2005.
- Li Y, Kong D, Bao B, Ahmad A, Sarkar FH. Induction of cancer cell death by isoflavone: the role of multiple signaling pathways. *Nutrients* 3:877-896, 2011.
- Li Y, Kucuk O, Hussain M, Abrams J, Cher ML, Sarkar FH. Antitumor and antimetastatic activities of docetaxel are enhanced by genistein through regulation of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/MMP-9 signaling in prostate cancer. *Cancer Research* 66:4816-4825, 2006.
- Li Z, Li J, Mo B, Hu C, Liu H, Qi H, et al. Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicol In Vitro* 22:1749-1753, 2008a.
- Li Z, Li J, Mo B, Hu C, Liu H, Qi H, et al. Genistein induces G2/M cell cycle arrest via stable activation of ERK1/2 pathway inMDAMB-231 breast cancer cells. *Cell Biol Toxicol* 24:401-409, 2008b.
- Liu D, Zhen W, Yang Z, Carter JD, Si H, Reynolds KA. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β -cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes* 55:1043-1050, 2006.
- Liu S, Vierthaler L, Tang W, Zhou J, Quarles LD. FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23. *J Am Soc Nephrol* 19:2342-2350, 2008.
- Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J of Phy Endocrinology and Metabolism* 291:E38-E49, 2006.
- Lötscher M, Kaissling B, Biber J, Murer H, Levi M. Role of microtubules in the rapid regulation of renal phosphate transport in response to acute alterations in dietary phosphate content. *J Clin Invest* 99:1302-1312, 1997.

- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor super-family: the second decade. *Cell* 83:835-39, 1995.
- Maruvada P, Baumann CT, Hager GL, Yen PM. Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* 278:12425-12432, 2003.
- Matsumoto C, Inada M, Toda K, Miyaura C. Estrogen and androgen play distinct roles in bone turnover in male mice before and after reaching sexual maturity. *Bone* 38:220-226, 2006.
- Matsumoto T, Sakari M, Okada M, Yokoyama A, Takahashi S, Kouzmenko A, et al. The androgen receptor in health and disease. *Annu Rev Physiol* 75:201-24, 2013.
- Meng J, Ohlsson C, Laughlin GA, Chonchol M, Wassel CL, Ljunggren O, et al. Associations of estradiol and testosterone with serum phosphorus in older men: the osteoporotic fractures in men study. *Kidney Int* 78:415-422, 2010.
- Mensenkamp AR, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Recent advances in renal tubular calcium reabsorption. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:524-529, 2006.
- Messina M, Ho S, Alekel DL. Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 7:649-658, 2010b.
- Messina M. Insights gained from 20 years of soy research. *Journal of Nutrition* 140:2289S-2295S, 2010a.
- Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, Shay N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *Journal of Nutrition* 133:1238-1243, 2003.
- Milošević V, Trifunović S, Filipović B, Šošić-Jurjević B, Pantelić J, Perčinić-Popovska F, Ajdžanović V. Estradiol and GH cells: immunohistomorphometric study in an animal model of andropause. *Arch Biol Sci* 64:451-457, 2012.
- Miyaura C, Toda K, Inada M, Ohshiba T, Matsumoto C, Okada T, et al. Sex and age-related response to aromatase deficiency in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1062-8, 2001.
- Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Molecular Endocrinology* 9:814-825, 1995.

- Morales A, Buvat J, Gooren LJ, Guay AT, Kaufman JM, Tan HM, et al. Endocrine aspects of sexual dysfunction in men. *J Sex Med* 1:69-81, 2004.
- Moutsatsou P. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones* 6:173-193, 2007.
- Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol Rev* 80:1373-1409, 2000.
- Nagai S, Okazaki M, Segawa H, Bergwitz C, Dean T, Potts JT Jr, et al. Acute down-regulation of sodium-dependent phosphate transporter NPT2a involves predominantly the cAMP/PKA pathway as revealed by signaling-selective parathyroid hormone analogs. *J Biol Chem* 286:1618-1626, 2011.
- Narayanan R, Jiang J, Gusev Y, Jones A, Kearbey JD, Miller DD, et al. MicroRNAs are mediators of androgen action in prostate and muscle. *PLoS ONE* 5:e13637, 2010.
- Naveh-Many T, Almogi G, Livni N, Silver J. Estrogen receptors and biologic response in rat parathyroid tissue and C cells. *J Clin Investig* 90:2434-2438, 1992.
- Naveh-Many T, Marx R, Keshet E, Pike JW, Silver J. Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the parathyroid in vivo. *J Clin Invest* 86:1968-1975, 1990.
- Naveh-Many T. Minireview: the play of proteins on the parathyroid hormone messenger ribonucleic acid regulates its expression. *Endocrinology* 151:1398-402, 2010.
- Nuti R. Calcium supplementation and risk of cardiovascular disease. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 9:133-134, 2012.
- Ohno S, Shinoda S, Toyoshima S, Nakazawa H, Makino T, Nakajin S. Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80:355-363, 2002.
- Okabe M, Graham A. The origin of the parathyroid gland. *PNAS* 101:17716-17719, 2004.
- Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T. Expression of estrogen receptor beta in rat bone. *Endocrinology* 138:4509-4512, 1997.
- Onoe Y, Miyaura C, Ito M, Ohta H, Nozawa S, Suda T. Comparative effects of estrogen and raloxifene on B-lymphopoiesis and bone loss induced by sex steroid deficiency in mice. *J Bone Miner Res* 15:541-549, 2000.

- Ortiz-Capisano MC, Ortiz PA, Garvin JL, Harding P, Beierwaltes WH. Expression and function of the calcium-sensing receptor in juxtaglomerular cells. *Hypertension* 50:737-743, 2007.
- Ouchi H, Ishiguro H, Ikeda N, Hori M, Kubota Y, Uemura H. Genistein induces cell growth inhibition in prostate cancer through the suppression of telomerase activity. *Int J Urol* 12:73-80, 2005.
- Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11:1043-1051, 1996.
- Pantelić J, Ajdžanović V, Medigović I, Mojić M, Trifunović S, Milošević V, et al. Genistein affects parathyroid gland and NaPi 2a cotransporter in an animal model of the andropause. *Journal of Physiology and Pharmacology* 64:361-368, 2013.
- Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Anagnostopoulou V, Konstantinidis G, Föller M, Gravanis A, et al. Membrane androgen receptor activation triggers down-regulation of PI-3K/Akt/NF-kappaB activity and induces apoptotic responses via Bad, FasL and caspase-3 in DU145 prostate cancer cells. *Molecular Cancer* 7:88, 2008.
- Parker MG. Transcriptional activation by oestrogen receptors. *Biochemical Society Symposium* 63:45-50, 1998.
- Pereira RC, Jüppner H, Azucena-Serrano CE, Yadin O, Salusky IB, Wesseling-Perry K. Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone* 45:1161-1168, 2009.
- Peterson G, Barnes S. Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 7:1345-1351, 1996.
- Pfister MF, Lederer E, Forgo J, Ziegler U, Lötscher M, Quabius ES, et al. Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/Pi cotransporters. *J Biol Chem* 272:20125-20130, 1997.
- Picard N, Capuano P, Stange G, Mihailova M, Kaissling B, Murer H, et al. Acute parathyroid hormone differentially regulates renal brush border membrane phosphate cotransporters. *Pflug Arch* 460:677-687, 2010.
- Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, et al. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *The Journal of Nutrition* 130:1675-1681, 2000.

- Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 130:1675-1681, 2000.
- Prince RL. Counterpoint: estrogen effects on calcitropic hormones and calcium homeostasis. *Endocr Rev* 15:301-309, 1994.
- Proell V, Xu H, Schüler C, Weber K, Hofbauer LC, Erben RG. Orchiectomy upregulates free soluble RANKL in bone marrow of aged rats. *Bone* 45:677-681, 2009.
- Razzaque MS. The FGF23–Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 5:611-619, 2009.
- Revankar MC, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307:1625-1630, 2005.
- Riccardi D, Brown EM. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney; *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F485-F499, 2010.
- Riccardi D, Hall AE, Chattopadhyay N, Xu JZ, Brown EM, Hebert SC. Localization of the extracellular Ca^{2+} -polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 274:F611-F622, 1998.
- Riccardi D, Lee WS, Lee K, Segre GV, Brown EM, Hebert SC. Localization of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 271:F951-F956, 1996.
- Riccardi D, Park J, Lee WS, Gamba G, Brown EM, Hebert SC. Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:131-135, 1995.
- Riccardi D, Traebert M, Ward DT, Kaissling B, Biber J, Hebert SC, et al. Dietary phosphate and parathyroid hormone alter the expression of the calcium-sensing receptor (CaR) and the Na^{+} -dependent Pi transporter (NaPi-2) in the rat proximal tubule. *Pflügers Arch* 441:379-387, 2000.
- Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, et al. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *Journal of Clinical Investigation* 112:683-692, 2003.
- Rogers JL, Mitchell AR, Maric C, Sandberg K, Myers A, Mulrone SE. Effect of sex hormones on renal estrogen and angiotensin type 1 receptors in female and male rats.

- American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 292: R794-R799, 2007.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321-333, 2002.
- Sampson N, Untergasser G, Plas E, Berger P. The ageing male reproductive tract. *J Pathol* 211:206-218, 2007.
- Sawai H, Okada Y, Funahashi H, Matsuo Y, Takahashi H, Takeyama H, et al. Activation of focal adhesion kinase enhances the adhesion and invasion of pancreatic cancer cells via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling pathway activation. *Molecular Cancer* 4:37, 2005.
- Segars JH, Driggers PH. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. *Trends Endocrinol Metab* 13:349-354, 2002.
- Setchell KDR, Faughnan MS, Avades T, Zimmer-Nechemias L, Brown NM, et al. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* February 77:411-419, 2003.
- Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6500-6505, 2001.
- Silver J, Kilav R, Naveh-Many T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F367-F376, 2002
- Silver J, Naveh-Many T, Mayer H, Schmeizer HJ, Popovtzer MM. Regulation by vitamin D metabolites of para-thyroid hormone gene transcription in vivo in the rat. *J Clin Invest* 78:1296-1301, 1986.
- Simpson ER, Maahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15:342-355, 1994.
- Somjne D, Katzburg S, Kohen F, Gayer B, Livne E. Daidzein but not other phytoestrogens preserves bone architecture in ovariectomized female rats in vivo. *Journal of Cellular Biochemistry* 103:1826-1832, 2008.

- Stock JL, Coderre JA, Mallette LE. Effects of a short course of estrogen on mineral metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 61:595-600, 1985.
- Suzuki R, Allen NE, Appleby PN, Key TJ, Dossus L, Tjønneland A, et al. Lifestyle factors and serum androgens among 636 middle-aged men from seven countries in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control* 20:811-821, 2009.
- Šošić-Jurjević B, Filipović B, Ajdžanović V, Brkić D, Ristić N, Stojanoski MM, et al. Subcutaneously administered genistein and daidzein decrease serum cholesterol and increase triglyceride levels in male middle-aged rats. *Exp Biol Med* 232:1222-1227, 2007.
- Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation* 109:1776-1782, 2004.
- Takeuchi S, Takahashi T, Sawada Y, Iida M, Matsuda T, Kojima H. Comparative study on the nuclear hormone receptor activity of various phytochemicals and their metabolites by reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32:195-202, 2009.
- Tang BMP, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *The Lancet* 370:657-666, 2007.
- Tenover JL. Testosterone replacement therapy in older adult men. *Int J Androl* 22:300-306, 1999.
- Terashima M, Toda K, Kawamoto T, Kuribayashi I, Ogawa Y, Maeda T, et al. Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P450. *Arch Biochem Biophys* 285:231-237, 1991.
- Traebert M, Volkl H, Biber J, Murer H, Kaissling B. Luminal and contraluminal action of 1-34 and 3-34 PTH peptides on renal type IIa Na-Pi cotransporter. *Am J Physiol Ren Physiol* 278:F792-799, 2000.
- Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol* 17:2393-2403, 2003.

- Uemura H, Irahara M, Yoneda N, Yasui T, Genjida K, Miyamoto KI, et al. Close correlation between estrogen treatment and renal phosphate reabsorption capacity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85:1215-1219, 2000.
- Van Abel M, Hoenderop JG, Dardenne O, St Arnaud R, Van Os CH, Van Leeuwen HJ, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaC1 in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 13:2102-2109, 2002.
- Van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, Friedlaender MM, Van Leeuwen JPTM, Bindels RJM. Coordinated control of renal Ca²⁺ transport proteins by parathyroid hormone. *Kidney Int* 68:1708-1721, 2005.
- Van de Graaf SF, Hoenderop JG, Gkika D, Lamers D, Prenen J, Rescher U, et al. Functional expression of the epithelial Ca²⁺ channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J* 22:1478-1487, 2003.
- Van de Graaf SFJ, Chang Q, Mensenkamp AR, Hoenderop JG, Bindels RJ. Direct interaction with Rab11a targets the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 26:303-312, 2006.
- Vance ML. Andropause. *Growth Hormone & IGF Research* 13, S90-S92, 2003.
- Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D. Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17 β -estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5 α -dihydrotestosterone. *J Bone Miner Res* 17:2080-2086, 2002.
- Vanderschueren D, Van Herck E, Suiker AM, Visser WJ, Schot LPC, Bouillon R. Bone and mineral metabolism in aged male rats: short- and long-term effects of androgen deficiency. *Endocrinology* 130:2906-2916, 1992.
- Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocrine Reviews* 25:389-425, 2004.
- Veldhuis JD. Aging and hormones of the hypothalamo-pituitary axis: gonadotropic axis in men and somatotropic axes in men and women. *Ageing Res Rev* 7:189-208, 2008.
- Vitale DC, Piazza C, Melilli B, Drago F, Salomone S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 38:15-25, 2013.
- Walker HA, Dean TS, Sanders TAB, Jackson G, Ritter JM, Chowienczyk PJ. The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilation of human

forearm vasculature with similar potency to 17 β -estradiol. *Circulation* 103:258-262, 2001.

Weinman EJ, Steplock D, Zhang Y, Biswas R, Bloch RJ, Shenolikar S. Cooperativity between the phosphorylation of Thr95 and Ser77 of NHERF-1 in the hormonal regulation of renal phosphate transport. *J Biol Chem* 285:25134-25138, 2010.

Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen regulation of immune cell bone interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1068:256-274, 2006.

Wernerson A, Widholm SM, Svensson O, Reinholt FP. Parathyroid cell number and size in hypocalcemic young rats. *APMIS* 99: 1096-1102, 1991.

Woclawek-Potocka I, Mannelli C, Boruszewska D, Kowalczyk-Zieba I, WaVniewski T, SkarHyNski DJ. Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: cow as a model. *International Journal of Endocrinology* 2013:Article ID 650984, 2013.

Wood RJ, Fleet JC, Cashman K, Bruns EM, Deluca HF. Intestinal calcium absorption in the aged rat: evidence of intestinal resistance to 1,25(OH)₂ vitamin D. *Endocrinology* 139:3843-3848, 1998.

Wu FC, Tajar A, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, et al. Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: the European male aging study. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2737-2745, 2008.

Xu L, Bergan RC. Genistein Inhibits Matrix Metalloproteinase Type 2 Activation and Prostate Cancer Cell Invasion by Blocking the Transforming Growth Factor-Mediated Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2–27-kDa Heat Shock Protein Pathway. *Mol Pharmacol* 70:869-877, 2006.

Yamashita T, Konishi M, Miyake A, Inui K, Itoh N. Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 277:28265-28270, 2002.

Yan GR, Yin XF, Xiao CL, Tan ZL, Xu SH, He QY. Identification of novel signaling components in genistein-regulated signaling pathways by quantitative phosphoproteomics. *Journal of Proteomics* 75:695-707, 2011.

Yang J, Singleton DW, Shaughnessy EA, Khan SA. The F-domain of estrogen receptor-alpha inhibits ligand induced receptor dimerization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 295:94-100, 2008.

Yokoshiki H, Sumii K, Sperelakis N. Inhibition of L-type calcium current in rat ventricular cells by the tyrosine kinase inhibitor, genistein and its inactive analog daidzein. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28:807-814, 1996.

Zhang HT, Wang Y, Deng XL, Dong MQ, Zhao LM, Wang YW. Daidzein relaxes rat cerebral basilar artery via activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology* 630:100-106, 2010.

Zhang QH, HuYZ, Zhou SS, Wang FZ. Inhibitory effect of genistein on the proliferation of the anterior pituitary cells of rats. *Sheng Li Xue Bao* 53:51-54, 2001.

BIOGRAFIJA

Jasmina Živanović rođena je 01. 02. 1981. godine u Valjevu. Studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Biologija, završila je 2008. godine sa prosečnom ocenom 8,97. Diplomski rad pod naslovom: „Uticaj ekstrakta semena biljke *Vitex agnus-castus* na C ćelije štitaste žlezde pacov “ uradila je u Odeljenju za citologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Bilogija ćelija i tkiva upisala je 2008. godine. Zvanje Istaživač saradnik stiče 2011. godine. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u Odeljenju za citologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ pod rukovodstvom dr Branka Filipovića, a u okviru projekta „Odgovor neuroendokrinog sistema pacova na odabrane biljne ekstrakte, fitoestrogene, steroidne i peptidne hormone“ (br. 173009) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Jasmina Živanović je do danas objavila 7 radova u časopisima međunarodnog značaja, ima 13 saopštenja na međunarodnim i 3 na domaćim naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Јасмина Живановић _____

број уписа _____ СО 070101 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Структурне и функционалне промене параштитастих жлезда и бубрега након примене стероида, изофлавона и калцијума у анималном моделу андропаузе

- 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, 25.10.2013.

Ј. Живановић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јасмина Живановић

Број уписа СО 070101

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада Структурне и функционалне промене параштитастих жлезда и бубрега након примене стероида, изофлавона и калцијума у анималном моделу андропаузе

Ментор др Бранко Филиповић и др Маја Ћакић-Милошевић

Потписани Јасмина Живановић

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, 25.10.2013.

Ј. Живановић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Структурне и функционалне промене параштитастих жлезда и бубрега након примене стероида, изофлавонона и калцијума у анималном моделу андропаузе

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.10.2013.



1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.