

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milica M. Perišić

**ULOGA HORMONA JAJNIKA U  
INVOLUCIJI TIMUSA  
PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milica M. Perišić

**ROLE OF OVARIAN HORMONES IN  
THYMIC INVOLUTION IN RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentori:

Dr sc. Gordana Leposavić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Biljana Božić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Članovi komisije:

Dr sc. Gordana Leposavić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Biljana Božić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Dr sc. Dragana Vučević, vanredni profesor,  
Univerzitet odbrane u Beogradu-Medicinski fakultet  
Vojnomedicinske akademije

Datum odbrane : \_\_\_\_\_

*Eksperimenti prikazani u ovom radu urađeni su u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Gordane Leposavić, u okviru projekata „Neuroendokrina modulacija imunskog odgovora: uloga simpato-adrenomedularnog sistema“ (145049) i „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja : Imunomodulatorni potencijal estrogena“ (175050) koje finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.*

*Mentoru prof. dr Gordani Leposavić zahvaljujem se na kompleksnoj i veoma interesantnoj temi, konstruktivnim savetima, kritičkim komentarima i uloženom trudu tokom vođenja rada.*

*Prof. dr Biljani Božić i prof. dr Dragani Vučević zahvaljujem se na interesovanju za moj rad, sugestijama i korisnim savetima u toku pisanja rada.*

*Kolegama iz laboratorije Dušku, Kaći i Ivanu, kao i kolegama sa Farmaceutskog fakulteta Neveni, Zorici, Jasmini, Mirjani, Vesni i Bilji dugujem veliku zahvalnost za neprocenjivu pomoć u eksperimentalnom delu ovog rada, korisnim sugestijama, razumevanju i podršci. Izrada ovog rada ne bi bila moguća bez saradnje i pomoći od strane ostalih kolega iz Centra, pri čemu se posebno zahvaljujem Slađi i Jasni, koje su uvek imale vremena (i pacova) za mene.*

*Posebno se zahvaljujem mojim roditeljima na razumevanju i podršci,  
i Marku, koji je uvek bio tu za mene.*



## *Rezime*

Timus je primarni limfoidni organ koji obezbeđuje mikrosredinu neophodnu za diferencijaciju/sazrevanje T-limfocita. Tokom ontogeneze, ovaj organ trpi značajne strukturne i funkcionalne promene koje se zbirno označavaju kao involucija timusa, i manifestuju se kao smanjena efikasnosti timopoeze i posledično, smanjen izlazak novoformiranih T-limfocita na periferiju. Involucija timusa je kod glodara najizraženija u periodu sticanja polne zrelosti. Veliki broj literaturnih podataka ukazuje na to da hormoni hipotalamo-hipofizo-gonadne (H-H-G) osovine, pre svega hormoni gonada, utiču na razvoj i involuciju timusa. Međutim, uprkos brojnim istraživanjima u proteklim decenijama, uloga hormona jajnika u inicijaciji i održavanju/progresiji involucije timusa nije do kraja rasvetljena.

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita uloga hormona jajnika u inicijaciji i održavanju/progresiji involucije timusa. U tom cilju ispitivan je uticaj jednokratnog davanja testosterona u kritičnom neonatalnom uzrastu, koji dovodi do odlaganja sazrevanja H-H-G osovine i promena u obrascu sekrecije hormona jajnika kod adultnih životinja (neonatalna androgenizacija) i uklanjanja jajnika ženkama pacova u uzrastu od 10 meseci, kada su involutivne promene timusa jasno izražene, na građu timusa i timopoezu u ranom adultnom uzrastu; odnosno u uzrastu od 11 meseci. Posebno je ispitivan, mogući, indirektan uticaj promena u sekreciji hormona jajnika na aktivnost timusnog kateholaminergičkog regulatornog sistema.

Neonatalna androgenizacija, delujući na različite stadijume diferencijacije/sazrevanja T-ćelija, od ulaska/diferencijacije progenitorskih ćelija do linijskog usmeravanja timocita, povećala je efikasnost timopoeze (na osnovu većeg broja svežih timusnih emigranata u perifernoj krvi i slezini), uključujući, najverovatnije, i povećano stvaranje ćelija regulatornog fenotipa (CD4+CD25+FoxP3+ i CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelije). Pored toga, kod ovih životinja je uočeno favorizovano stvaranje ćelija CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> fenotipa (fenotipska defeminizacija/maskulinizacija procesa timopoeze). Uprkos povećanoj efikasnosti timopoeze, nepromenjena relativna zastupljenost timusnih epitelnih ćelija (TEC) kao i nivo iRNK za IL-6, a smanjen nivo iRNK za IL-7 u tkivu timusa, ukazuju, da je kod

neonatalno androgenizovanih životinja, u uzrastu od 3 meseca, najverovatnije, došlo do pokretanja mehanizama negativne povratne sprege, koji ograničavaju ekspanziju TEC i timopoezu.

Ovarijsktomija u uzrastu od 10 meseci, nakon 30. dana, imala je za posledicu povećanje relativne zastupljenosti TEC i efikasnosti timopoeze (uključujući i povećano stvaranje ćelija regulatornog fenotipa), što se manifestovalo povećanim brojem svežih timusnih emigranata CD4+ i CD8+ fenotipa u perifernoj krvi i slezini. Međutim, uprkos regeneraciji epitelne komponente timusa i povećanoj efikasnosti timopoeze, smanjen nivo mRNA za IL-6 i IL-7 u tkivu timusa ovarijsktomisani životinja sugeriraju da je kod ovih životinja došlo do aktivacije intratimusnih mehanizama negativne povratne sprege koji ograničava ekspanziju TEC koje sintetišu IL-6 i efikasnost timopoeze.

U zaključku, nalazi dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju da neonatalna androgenizacija menja kinetiku postnatalnog razvoja timusa i polno specifičan obrazac diferencijacije/sazrevanja timocita i odlaže, ali vrlo verovatno ne sprečava involuciju timusa, dok uklanjanje hormona jajnika u uzrastu kada su involutivne promene timusa uznapredovale dovodi do delimične reverzije ovih promena i efikasnije timopoeze, koji su, najverovatnije, vremenski ograničenog trajanja. Pored toga, pokazano je da se uticaj hormona jajnika na ove procese odvija i indirektno, menjanjem efikasnosti modulatornog delovanja noradrenalina na timopoezu.

**Ključne reči:** involucija timusa; hormoni jajnika; timusne epitelne ćelije; timopoeza; IL-6; IL-7; noradrenalin; adrenergički receptori; sveži timusni emigranti; regulatorne T-ćelije;

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Imunologija

**UDK broj:** 591.465.3::577.6]:591.443]:599.45 (043.3)

## *Summary*

The thymus is a primary lymphoid organ that provides the microenvironment necessary for the differentiation/maturation of T-lymphocytes. During ontogeny, thymus undergoes significant structural and functional changes leading to reduced efficiency of thymopoiesis and, consequently, reduced output of newly generated T-lymphocytes. These changes are collectively referred to as thymic involution. The most profound thymic changes in rodents, occur around puberty. There is an accumulating body of evidence indicating that hormones of the hypothalamic-pituitary-gonadal (H-P-G) axis, particularly gonadal hormones, influence thymic development and involution. However, despite extensive research in the past decades, the role of ovarian hormones in the initiation and maintenance/progression of thymic involution is not fully understood.

Bearing all aforementioned in mind, this dissertation was aimed to elucidate the role of ovarian hormones in initiation and maintenance/progression of thymic involution. To this end the effects of single injection of testosterone in critical postnatal period, which postpones H-P-G axis maturation and affects the gender-specific pattern of gonadal hormone secretion in adult animals (neonatal androgenization), and ovarian hormone removal in rats with advanced thymic involutive changes (10-month-old), on thymic structure and function, were examined in 3-month-old and 11-month-old female rats, respectively. In addition, the putative indirect, catecholamine-mediated effects of the neonatal androgenization and ovariectomy on thymopoiesis were explored.

Neonatal androgenization, affecting distinct stages of thymocyte differentiation/maturation (from progenitor cell entry and differentiation to thymocyte lineage commitment), increased the efficiency of thymopoiesis and consequently thymic output (as evidenced by the increased number of recent thymic emigrants in peripheral blood and spleen), including, most likely, increased output of the cells with regulatory phenotype (CD4+CD25+FoxP3+ and CD161+TCR $\alpha\beta$ + cells). In addition, neonatal treatment with testosterone skewed thymocyte lineage commitment towards CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> cells (phenotypic defeminization/masculinization of thymopoiesis). Despite the increased efficiency of thymopoiesis, unaltered relative

abundance of thymic epithelial cells (TEC) and the thymic level of IL-6 mRNA, and reduced thymic level of IL-7 mRNA, indicated, most likely, activation of intrathymic negative feedback mechanisms limiting TEC proliferation and thymopoiesis in 3-month-old neonatally androgenized rats.

Ovariectomy at the age of 10 months led to the expansion of TECs and greater efficiency of thymopoiesis (including generation of cells with regulatory phenotype), increasing the number of both CD4+ and CD8+ recent thymic emigrants in peripheral blood and spleen of 11-month-old rats, compared with age-matched controls. However, despite the regeneration of the thymic epithelial component and increased efficiency of thymopoiesis, reduced thymic levels of mRNA for IL-6 and IL-7 in ovariectomized rats indicated activation of intrathymic negative feedback mechanisms limiting the expansion of IL-6-synthesizing TECs and thymopoietic efficiency in these animals.

In conclusion, the data obtained in this dissertation indicate that neonatal androgenization alters the kinetics of postnatal thymic development and sex-specific pattern of thymocyte differentiation/maturation and postpones thymic involution, but, most likely, does not prevent it completely. The removal of ovarian hormones in female rats with advanced thymic involutive changes leads to partial reversion of these changes, and an increase in thymopoietic efficiency of, most likely, limited duration. In addition, these data indicate that ovarian hormones might affect thymic development/involution not only directly, but also indirectly by diminishing the efficiency of noradrenaline-mediated modulation of thymopoiesis.

**Keywords:** thymic involution; ovarian hormones; thymic epithelial cells; thymopoiesis; IL-6; IL-7; noradrenaline; adrenergic receptors; recent thymic emigrants; regulatory T-cells;

**General subject area:** Biology

**Subject area:** Immunology

**UDK number:** 591.465.3::577.6]:591.443]:599.45 (043.3)

---

# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b>  |           |
| <b>1.1. Građa timusa</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1.1. Timusne epitelne ćelije  | 2         |
| 1.1.1.1. Epitelne ćelije korteksa   | 3         |
| 1.1.1.2. Epitelne ćelije medule   | 4         |
| 1.1.2. Ćelije koje vode poreklo od mezenhima  | 4         |
| 1.1.3. Ćelije poreklom iz kostne srži   | 5         |
| 1.1.3.1. Makrofage  | 5         |
| 1.1.3.2. Dendritične ćelije   | 5         |
| <b>1.2. Diferencijacija i sazrevanje T-ćelija u timusu</b>  | <b>6</b>  |
| 1.2.1. Naseljavanje timusa i rani (TCR nezavisni) stadijum diferencijacije timocita                     | 7         |
| 1.2.2. Kasni (TCR zavisni) stadijum diferencijacije/sazrevanja timocita                                 | 10        |
| 1.2.2.1. Pozitivna selekcija  | 10        |
| 1.2.2.2. Linijsko usmeravanje   | 12        |
| 1.2.2.3. Negativna selekcija  | 14        |
| 1.2.2.4. Selekcija agonistom  | 16        |
| 1.2.2.4.1. Regulatorne T-ćelije   | 16        |
| 1.2.2.4.2. NKT ćelije   | 18        |
| <b>1.3. Sveži timusni emigranti</b>   | <b>20</b> |
| <b>1.4. Diferencijacija/sazrevanje T-ćelija i hormoni jajnika</b>                                       | <b>21</b> |
| 1.4.1. Ekspresija receptora za estrogen u timusu  | 22        |
| 1.4.2. Ekspresija receptora za progesteron u timusu   | 22        |
| 1.4.3. Uticaj hormona jajnika na diferencijaciju/sazrevanje timocita                                    | 23        |
| <b>1.5. Interakcija hormona jajnika i kateholamina u regulaciji diferencijacije/sazrevanja timocita</b> | <b>26</b> |
| <b>1.6. Timusne promene tokom ontogeneze</b>  | <b>26</b> |
| <b>1.7. Involucija timusa i polni hormoni</b>   | <b>29</b> |
| <b>2. CILJEVI</b>   | <b>33</b> |

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. MATERIJAL I METODE</b>   |           |
| <b>3.1. Eksperimentalne životinje</b>  | <b>35</b> |
| 3.1.1. Eksperimentalne grupe   | 35        |
| 3.1.2. Dozvola Etičkog komiteta  | 36        |
| <b>3.2. Eksperimentalni protokol</b>   | <b>36</b> |
| 3.2.1. Neonatalna androgenizacija  | 36        |
| 3.2.2. Hirurško uklanjanje jajnika   | 37        |
| 3.2.3. Određivanje koncentracije gonadnih hormona u serumu životinja   | 38        |
| <b>3.3. Hemikalije, antitela i imunokonjugati</b>  | <b>39</b> |
| <b>3.4. Protočna fluorocitometrija</b>   | <b>41</b> |
| 3.4.1. Priprema ćelijskih suspenzija   | 41        |
| 3.4.2. Priprema uzoraka za analizu ekspresije membranskih antigena   | 42        |
| 3.4.3. Priprema uzoraka za analizu ekspresije intracelularnih antigena   | 42        |
| 3.4.4. Magnetno razdvajanje ćelija na osnovu ekspresije površinskih antigena   | 44        |
| 3.4.5. Analiza uzoraka protočnom fluorocitometrijom  | 45        |
| <b>3.5. Određivanje apoptotičnih ćelija u kulturi</b>  | <b>46</b> |
| <b>3.6. Analiza ćelijskog ciklusa</b>  | <b>47</b> |
| 3.6.1. Određivanje sadržaja DNK upotrebom PI   | 47        |
| 3.6.2. Ispitivanje sinteze DNK na osnovu ugradnje BrdU u kulturi timocita  | 48        |
| <b>3.7. Imunohistohemijsko i histohemijsko bojenje tkiva</b>   | <b>49</b> |
| 3.7.1. Identifikacija i karakterizacija ćelija koje ispoljavaju tirozin hidroksilazu i citokeratine                        | 49        |
| <b>3.8. Određivanje apoptotičnih ćelija na presecima tkiva</b>   | <b>50</b> |
| <b>3.9. Identifikacija monoamina upotrebom saharoza-kalijumfosfat-glioksalne kiseline</b>                                  | <b>51</b> |
| <b>3.10. Određivanje koncentracije kateholamina reverzno-faznom tačnom hromatografijom pod visokim pritiskom (RP HPLC)</b> | <b>53</b> |
| 3.10.1. Priprema uzoraka za RP HPLC  | 53        |
| 3.10.2. Određivanje koncentracije kateholamina RP HPLC metodom   | 53        |
| <b>3.11. Analiza ekspresije gena za IL-6 i IL-7 u timusu</b>   | <b>54</b> |
| 3.11.1. Izolacija ukupne RNK   | 54        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 3.11.2. Transkripcija RNK u cDNK  | 55        |
| 3.11.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu   | 55        |
| <b>3.12. Statistička obrada rezultata</b>   | <b>56</b> |
| <b>4. REZULTATI</b>   |           |
| <b>4.1. Uticaj jednokratnog davanja testosterona u kritičnom neonatalnom periodu na timus odraslih ženki pacova</b>                       | <b>57</b> |
| 4.1.1. Koncentracija estradiola, progesterona i testosterona u serumu   | 57        |
| 4.1.2. Receptori za polne steroide  | 57        |
| 4.1.3. Masa timusa i broj timocita  | 59        |
| 4.1.4. Zastupljenost timusnih epitelnih ćelija  | 59        |
| 4.1.5. Ekspresija gena za IL-6 i IL-7   | 60        |
| 4.1.6. Apoptoza i proliferacija timocita odraslih ženki pacova  | 61        |
| 4.1.6.1. Apoptoza timocita  | 61        |
| 4.1.6.2. Proliferacija timocita   | 64        |
| 4.1.7. Uticaj neonatalne androgenizacije na fenotipske karakteristike timocita  | 69        |
| 4.1.7.1. Ekspresija CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$  | 69        |
| 4.1.7.2. Ekspresija TCR $\alpha\beta$ , CD2 i CD45RC molekula na CD4-CD8- timocitima  | 74        |
| 4.1.7.3. Ekspresija CD90  | 75        |
| 4.1.7.4. Ćelije CD4+CD25+FoxP3+ fenotipa  | 78        |
| 4.1.7.5. Ćelije CD161+TCR $\alpha\beta$ +fenotipa   | 79        |
| 4.1.8. Uticaj neonatalne androgenizacije na sveže timusne emigrante, konvencionalne i regulatorne T-limfocite u perifernoj krvi i slezini | 80        |
| 4.1.8.1. Sveži timusni emigranti  | 80        |
| 4.1.8.2. TCR $\alpha\beta$ +, CD4+ i CD8+ T-limfociti   | 82        |
| 4.1.8.3. Ćelije CD4+CD25+FoxP3+ fenotipa  | 85        |
| 4.1.8.4. Ćelije CD161+TCR $\alpha\beta$ + fenotipa  | 86        |
| 4.1.9. Uticaj neonatalne androgenizacije na koncentraciju kateholamina u timusu i ekspresiju adrenergičkih receptora na timocitima        | 87        |
| 4.1.9.1. Koncentracija kateholamina u timusu  | 87        |
| 4.1.9.2. Kateholaminska nervna vlakna u timusu  | 88        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1.9.3. Čelije koje sintetišu kateholamine u timusu  | 90        |
| 4.1.9.4. Ekspresija $\beta_2$ -adrenergičkih receptora na timocitima  | 93        |
| 4.1.9.5. Ekspresija $\alpha_{1B}$ -adrenergičkih receptora na timocitima  | 94        |
| <b>4.2. Uticaj uklanjanja jajnika na timus 11 meseci starih ženki pacova</b>  | <b>96</b> |
| 4.2.1. Koncentracija estradiola i progesterona u serumu   | 96        |
| 4.2.2. Ekspresija receptora za estrogen   | 97        |
| 4.2.3. Masa timusa i broj timocita  | 97        |
| 4.2.4. Zastupljenost timusnih epitelnih ćelija  | 98        |
| 4.2.5. Ekspresija gena za IL-6 i IL-7   | 99        |
| 4.2.6. Apoptoza i proliferacija timocita odraslih ženki pacova  | 100       |
| 4.2.6.1. Apoptoza timocita  | 100       |
| 4.2.6.2. Proliferacija timocita   | 102       |
| 4.2.7. Uticaj ovarijske neoplazije na fenotipske karakteristike timocita  | 104       |
| 4.2.7.1. Ekspresija CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$  | 104       |
| 4.2.7.2. Ekspresija TCR $\alpha\beta$ , CD2 i CD45RC molekula na CD4-CD8- timocitima  | 107       |
| 4.2.7.3. Ekspresija CD90  | 108       |
| 4.2.7.4. Čelije CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> fenotipa  | 110       |
| 4.2.7.5. Čelije CD161 <sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> fenotipa  | 110       |
| 4.2.8. Uticaj ovarijske neoplazije na sveže timusne emigrante, konvencionalne i regulatorne T-limfocite u perifernoj krvi i slezini | 111       |
| 4.2.8.1. Sveži timusni emigranti  | 111       |
| 4.2.8.2. TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> i CD8 <sup>+</sup> T-limfociti   | 113       |
| 4.2.8.3. Čelije CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> fenotipa  | 114       |
| 4.2.8.4. Čelije CD161 <sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> fenotipa  | 115       |
| 4.2.9. Uticaj ovarijske neoplazije na koncentraciju kateholamina u timusu i ekspresiju adrenergičkih receptora na timocitima        | 116       |
| 4.2.9.1. Koncentracija kateholamina u timusu  | 116       |
| 4.2.9.2. Kateholaminska nervna vlakna u timusu  | 117       |
| 4.2.9.3. Čelije koje sintetišu kateholamine u timusu  | 119       |
| 4.2.9.4. Ekspresija $\beta_2$ -adrenergičkih receptora na timocitima  | 121       |



---

|  |            |
|--|------------|
| 4.2.9.5. Ekspresija $\alpha_{1B}$ -adrenergičkih receptora na timocitima   | 122        |
| <b>5. DISKUSIJA</b>  |            |
| <b>5.1. Neonatalna androgenizacija</b>   | <b>124</b> |
| 5.1.1. Uticaj neonatalne androgenizacije na masu i celularnost timusa  | 124        |
| 5.1.2. Uticaj neonatalne androgenizacije na sazrevanje T-ćelija  | 126        |
| 5.1.3. Uticaj neonatalne androgenizacije na fenotipske karakteristike T-limfocita u perifernoj krvi i slezini                          | 131        |
| 5.1.3.1. Uticaj neonatalne androgenizacije na ćelije sa regulatornim fenotipom   | 133        |
| 5.1.3.1.1. CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelije  | 133        |
| 5.1.3.1.2. CD4+CD25+FoxP3+ ćelije  | 134        |
| 5.1.4. Uticaj neonatalne androgenizacije na zastupljenost timusnih epitelnih ćelija i ekspresiju gena za IL-6 i IL-7 u tkivu timusa    | 135        |
| 5.1.5. Uticaj neonatalne androgenizacije na koncentraciju noradrenalina u timusu i zastupljenost adrenergičkih receptora na timocitima | 138        |
| <b>5.2. Uticaj ovarijektomije na timus odraslih životinja</b>  | <b>146</b> |
| 5.2.1. Uticaj ovarijektomije na masu i celularnost timusa  | 146        |
| 5.2.2. Uticaj ovarijektomije na sazrevanje T-ćelija  | 148        |
| 5.2.3. Uticaj ovarijektomije na fenotipske karakteristike T-limfocita u perifernoj krvi i slezini                                      | 152        |
| 5.2.3.1. Uticaj ovarijektomije na ćelije sa regulatornim fenotipom   | 154        |
| 5.2.3.1.1. CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelije  | 154        |
| 5.2.3.1.2. CD4+CD25+FoxP3+ ćelije  | 155        |
| 5.2.4. Uticaj ovarijektomije na zastupljenost timusnih epitelnih ćelija i ekspresiju gena za IL-6 i IL-7 u tkivu timusa                | 156        |
| 5.2.5. Uticaj ovarijektomije na koncentraciju noradrenalina u timusu i zastupljenost adrenergičkih receptora na timocitima             | 158        |
| <b>6. ZAKLJUČCI</b>  | <b>166</b> |
| <b>7. LITERATURA</b>   | <b>169</b> |

## **1. UVOD**

### **1.1. Građa timusa**

Timus je primarni limfoidni organ u kome se odvijaju procesi diferencijacije i sazrevanja timocita, i tako obezbeđuje kontinualno snabdevanje periferije imunokompetentnim T-limfocitima, neophodnim za uspostavljanje efikasnog imunskog odgovora.

Kod sisara, timus se razvija od endoderma treće faringealne kese i okolnog mezenhima (Boehm i sar., 1995; Boehm i Bleul, 2006). Tokom embrionalnog razvoja, timusni začetak migrira kaudalno u toraks, a zatim dolazi do početne diferencijacije epitelnih ćelija (Boehm i Bleul, 2006). Ove ćelije formiraju labavu „mrežu“ odvojenu krvnim sudovima, koju 13-15. dana gestacije kod pacova, a 11-12. dana gestacije kod miša, naseljavaju limfocitni progenitori, kada i započinje diferencijacija timocita (Zuniga-Pflucker i Lenardo, 1996, Bleul i sar., 2006).

Timus sisara smešten je u medijastinumu, neposredno ispred srca i sastoji se od dva lobusa obavijena vezivnom kapsulom. Lobusi timusa su vezivno-tkivnim pregradama (septama), podeljeni na više lobulusa. Funkcijski i anatomski svaki lobus timusa može se podeliti na: spoljašnji odeljak-korteks i unutrašnji odeljak-medula. U korteksu, koji čine gusto pakovani nezreli timociti u mreži nelimfoidnih ćelija, mogu se razlikovati subkapsularni/subseptalni, spoljašnji i unutrašnji odeljak. Region bogat dendritičnim ćelijama (engl. dendritic cells, DC) i krvnim sudovima razdvaja medulu od korteksa i označava se kao kortiko-medularna zona (KMZ). Timusna medula se histološki razlikuje od korteksa, karakteriše je prisustvo ređe raspoređenih timocita i prisustvo terminalno diferenciranih timusnih epitelnih ćelija (engl. thymic epithelial cells, TEC) koje se nazivaju Hasalova tela. Ovakva organizacija timusa prisutna je kod svih kičmenjaka što ukazuje na njen funkcionalni značaj (Rodewald, 2008).

Ubedljivo najveći deo ćelijske populacije timusa (99%) čine T-ćelije u razvoju, timociti (Manley i sar., 2012). Međutim, iako su manje brojne, ćelije timusne strome

veoma su značajne za uspostavljanje i održavanje normalne strukture organa, kao i za razvoj imunokompetentnih T-limfocita. U sastav strome timusa ulaze TEC, mezenhimske ćelije poreklom od nervne kreste (Gray i sar., 2007), kao i ćelije koje vode poreklo iz kostne srži (Boyd i sar., 1993). Ove ćelije formiraju specijalizovane mikrosredine ili „niše“, koje obezbeđuju optimalne uslove za odvijanje različitih stadijuma diferencijacije i sazrevanja timocita (Boyd i sar., 1993). Značajnu komponentu timusne mikrosredine čini i vanćelijski matriks koji je neophodan za ostvarivanje međućelijskih komunikacija u timusu, kao i za kretanje timocita (Surh i Sprent, 1994). Vanćelijski matriks sastoji se uglavnom od kolagena, laminina, fibronektina i retikularnih vlakana (Surh i Sprent, 1994).

Migracija timocita kroz različite mikrosredine timusa neophodna je za njihovu diferencijaciju i sazrevanje, i vođena je brojnim signalima koje obezbeđuju direktne ćelijsko-ćelijske interakcije, kao i interakcije sa adhezivnim molekulima ekstraćelijskog matriksa i hemokinima, poreklom od ćelija strome timusa (Boyd i sar., 1993; Prockop i sar., 2002; Savino i sar., 2004). Sa druge strane, uzajamne limfo-stromalne interakcije od ključnog su značaja za formiranje i održavanje specijaliziranih mikrosredina timusa (Kyewski, 1987; Anderson i sar., 1993; van Ewijk i sar., 1994).

### ***1.1.1. Timusne epitelne ćelije***

Dominantnu komponentu timusne strome čine TEC. One su međusobno tesno povezane dezmozomima formirajući trodimenzionalnu mrežu u koju se infiltriraju ostale ćelije strome timusa i timociti (van Ewijk i sar., 1988, van Ewijk, 1991, Boyd i sar., 1993).

TEC učestvuju u procesu diferencijacije/sazrevanja timocita, kako direktnim kontaktom sa timocitima, tako i sekrecijom brojnih solubilnih molekula kao što su citokini, faktori rasta (Min i sar., 2002; Plotkin i sar., 2003; Rossi i sar., 2007), neuropeptidi, hormoni (Savino i sar., 2004), adhezivni molekuli (Prockop i sar., 2002) i hemokini koji obezbeđuju i usmeravaju kretanje timocita (Plotkin i sar., 2003; Gray i sar., 2006; Takahama, 2006; Petrie i Zuninga-Pflucker, 2007).

Morfološki, fenotipski i funkcijski TEC predstavljaju veoma heterogenu populaciju ćelija. Imunocitohemijskim obeležavanjem TEC se mogu podeliti na četiri subpopulacije ćelija: subkapsularne, ćelije dubokog korteksa, medularne i Hasalova tela (Rezzani i sar., 2008). Ultrastrukturnom analizom, međutim, pokazano je da se kod čoveka (van de Wijngaert i sar., 1984 ) i kod pacova može razlikovati šest tipova TEC raspoređenih u različitim timusnim odeljcima (De Waal i Rademakers, 1997).

#### *1.1.1.1. Epitelne ćelije korteksa*

Epitelne ćelije timusnog korteksa (kTEC) orijentisane su perpendikularno na kapsulu timusa i svojim izduženim nastavcima formiraju karakterističnu mrežu (Gray i sar., 2006). Ove ćelije su ključne za normalno odvijanje najranijih stadijuma diferencijacije timocita, kao i za proces pozitivne selekcije (Anderson i sar., 2007), a pokazano je da je za formiranje i održavanje trodimenzionalne mreže kTEC neophodna interakcija ovih ćelija sa najnezrelijim timocitima (Anderson i sar., 1993; van Ewijk i sar., 1994; van Ewijk i sar., 2000).

Na osnovu ultrastrukturne analize, kod pacova se mogu razlikovati četiri tipa TEC u korteksu (De Waal i Rademakers, 1997). U subkapsularnom, paraseptalnom i perivaskularnom regionu locirane su izdužene kTEC, koje pripadaju **tipu 1** TEC. Ove ćelije mogu biti različite elektronske gustine, sadrže euhromatinsko jedro, izražene tonofilamente, razvijen Goldži kompleks i endoplazmatični retikulum, i imaju svetle vakuole. Blede TEC ćelije, lokalizovane uglavnom u spoljašnjem korteksu označene su kao **tip 2**. Imaju svetlu citoplazmu i veliko jedro, kao i mnoštvo organela i brojne vakuole. Svetle ćelije, koje se nalaze u svim zonama korteksa, označene su kao **tip 3** TEC i smatra se da one predstavljaju prelazni tip ćelija između **tipa 2** i **4**. U citoplazmi nekih TEC **tipa 2** i **3** može se naći različiti broj timocita i ove ćelije su dobile naziv timusne ćelije dadilje (engl. thymic nurse cells, TNC). Smatra se da TNC imaju značajnu ulogu u procesima selekcije timocita (Boyd i sar., 1993). U KMZ timusa, locirane su tamne ćelije koje su označene kao **tip 4** TEC.

### ***1.1.1.2. Epitelne ćelije medule***

TEC smeštene u timusnoj meduli (mTEC) luče neophodne faktore rasta i hemokine koji obezbeđuju usmereno kretanje zrelih timocita i zajedno sa DC, posreduju u negativnoj selekciji timocita i uspostavljanju centralne tolerance (Anderson i sar., 2007; Williams i sar., 2008). Za potpuno formiranje timusne medule tokom embrionalnog razvoja, kao i za održavanje njene strukture i funkcije tokom ontogeneze, neophodna je interakcija mTEC sa timocitima koji su prošli pozitivnu selekciju (Akiyama i sar., 2008; Hikosaka i sar., 2008; White i sar., 2008).

Na osnovu ultrastrukturnih karakteristika mTEC pacova mogu se podeliti na dva tipa ćelija (De Waal i Rademakers, 1997). Slabo diferencirane ćelije, koje su obično locirane na medularnoj strani KMZ i imaju kratke citoplazmatske nastavke, ovoidno jedro bogato heterohromatinom i malo organela, označene su kao **tip 5** TEC. Velike, svetle ćelije, koje formiraju mrežu u meduli su označene kao **tip 6** TEC. Ove ćelije sadrže brojne citoplazmatske organele kao i sekretorne granule u blizini plazma membrane, pa se pretpostavlja da sekretuju timusne hormone i citokine (De Waal i Rademakers, 1997).

### ***1.1.2. Ćelije koje vode poreklo od mezenhima***

Ćelije timusne strome poreklom od mezenhima formiraju timusnu kapsulu i septe (fibroblasti i fibrociti) i doprinose njegovoj vaskularizaciji (ćelije endotela timusnih krvnih sudova i miociti) (Anderson i sar., 2000, Muller i sar., 2005; Gray i sar., 2007). Tokom embrionalnog razvića ćelije poreklom od mezenhima svojim solubilnim produktima regulišu proliferaciju TEC, a time, posredno, i veličinu timusnih „niša“ (Jenkinson i sar., 2007). Nakon rođenja, ove ćelije luče brojne faktore neophodne za preživljavanje i proliferaciju TEC, kao što su: faktor rasta fibroblasta 7 (engl. fibroblast growth factor 7, FGF7), FGF10 i faktor rasta keratinocita (engl. keratinocyte growth factor, KGF) (Jenkinson i sar., 2007; Anderson i sar., 2009).

### **1.1.3. Čelije poreklom iz kostne srži**

Najbrojniju populaciju ćelija poreklom iz kostne srži svakako čine timociti, ali pored njih, u timusu se mogu naći i: makrofagi, DC, urođenoubilačke (engl. natural killer cells, NK) ćelije, urođenoubilačke T-ćelije (engl. natural killer T-cells, NKT) , B-limfociti, eozinofili, bazofili itd.

#### **1.1.3.1. Makrofage**

Timusni makrofagi predstavljaju heterogenu populaciju mobilnih ćelija smeštenih u svim timusnim odeljcima. To su krupne nelimfoidne ćelije, sa brojnim citoplazmatskim produžetcima i citoplazmom bogatom lizozomima sa hidrolitičkim enzimima (kisela i alkalna fosfataza, esteraze i sl.). Na površini ovih ćelija nalaze se brojne adhezivne molekule (CD14, CD15, CD16, CD44, CD54, CD68, CD106) (Surh i Sprent, 1994). Ove ćelije mogu nastati od monocita koji iz cirkulacije dospevaju u timus (Sminia i sar., 1986; Vicente i sar., 1995), i/ili od progenitorskih ćelija koje naseljavaju timus, a zadržavaju sposobnost da se diferenciraju u makrofage (Wu i sar., 1991; Shortman i sar., 1998). Smatra se da ove ćelije imaju prevashodno ulogu u uklanjanju timocita koji umiru tokom procesa selekcije (Inaba i sar., 1988; Surh i Sprent, 1994). Pokazano je takođe, da ove ćelije, sintezom solubilnih molekula, mogu uticati na procese diferencijacije i sazrevanja timocita (Surh i Sprent, 1994).

#### **1.1.3.2. Dendritične ćelije**

Dendritične ćelije u timusu predstavljaju fenotipski i funkcionalno heterogenu populaciju ćelija. Kod miša se prema ekspresiji karakterističnih površinskih antigena timusne DC mogu podeliti na dve glavne populacije: konvencionalne DC (cDC), koje odlikuje visoka ekspresija CD11c, i plazmacitoidne DC (pDC) koje odlikuje niža ekspresija CD11c. Pokazano je da oko dve trećine timusnih cDC vodi poreklo od progenitorskih ćelija koje naseljavaju timus i zadržavaju sposobnost da se diferenciraju u cDC (Wu i sar., 1991), dok deo cDC, kao i sve pDC u timus ulaze sa periferije (Donskoy i Goldschneider, 2003, Proietto i sar., 2008, Li i sar., 2009). Iako se u

fiziološkim uslovima cDC u timusu nalaze u neaktivisanom stanju, ove ćelije na svojoj membrani ispoljavaju umeren nivo ekspresije MHC molekula II klase, dok pojedine timusne cDC odlikuje i viši nivo ekspresije CD80 i CD86 kostimulatornih molekula nego u drugim limfoidnim organima (Wilson i sar., 2003). Timusne DC doprinose eliminaciji potencijalno autoreaktivnih timocita u procesu negativne selekcije (Dakić i sar., 2004). Osim toga, pretpostavlja se da ove ćelije učestvuju u proliferaciji zrelih, medularnih timocita (Ardavin, 1997). Ovo potkrepljuju i podaci da su kod miša i pacova DC dominantno lokalizovane u meduli i KMZ timusa, a samo mali broj ovih ćelija može se naći u timusnom korteksu (Sprent i Webb, 1995, Kurobe i sar., 2006).

### ***1.2. Diferencijacija i sazrevanje T-ćelija u timusu***

T-limfociti su jedinstvene ćelije koje na svojoj membrani ispoljavaju visoko raznolike antigenske receptore, zahvaljujući kojima su sposobni da prepoznaju veliki broj stranih antigena i da na njih adekvatno odgovore. Najbrojnija populacija T-limfocita na svojoj površini ispoljava  $\alpha\beta$  heterodimerni T-ćelijski receptor (engl. T-cell receptor, TCR), koji prepoznaje strane peptide isključivo u sklopu sopstvenih glavnih molekula tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex, MHC). Za imunski sistem su funkcionalno korisni jedino T-limfociti koji imaju sposobnost prepoznavanja stranog antigena (Ag) ispoljenog u sklopu sopstvenog MHC. Ovakvi, funkcionalno kompetentni T-limfociti nastaju od nezrelih ćelija kostne srži kroz višestepeni proces, koji se u adultnom uzrastu uglavnom odvija u timusu.

Proces diferencijacije/sazrevanja T-ćelija u timusu grubo se može podeliti na dve faze. Prva faza podrazumeva ekspresiju gena za antigenske receptore i formiranje TCR različitih specifičnosti. Druga faza podrazumeva odabir T-ćelija koje su ispoljile TCR čija specifičnost odgovara sopstvenim MHC molekulima, odnosno T-ćelija, čija je antigenska specifičnost potencijalno „korisna“ (Zúñiga-Pflücker i Lenardo, 1996; Zamoyska i Lovatt, 2004). Odabir ovakvih T-ćelija pokreće čitav niz razvojnih događaja, uključujući linijsko usmeravanje, prekid rearanžmana gena za TCR, kao i migraciju timocita iz timusnog korteksa u medulu, gde se uglavnom odvijaju procesi neophodni za uspostavljanje tolerancije na sopstvene antigene (Wang i sar., 2010).

### ***1.2.1. Naseljavanje timusa i rani (TCR nezavisni) stadijum diferencijacije timocita***

Timus ne sadrži hematopoetske matične ćelije, i nakon rođenja, razvoj T-ćelija u timusu u potpunosti je zavisan od naseljavanja timusa pluripotentnim ćelijama kostne srži (Serwold i sar., 2009).

Hematopoetske matične ćelije (engl. hematopoietic stem cell, HSC) borave u kostnoj srži u specijaliziranim mikrosredinama, u bliskom kontaktu sa ćelijama strome, koje lučenjem citokina, hemokina i faktora rasta regulišu njihovu proliferaciju i migraciju, a time i veličinu populacije HSC (Sitnicka, 2009). Iako brojne ćelije koje nastaju iz HSC poseduju T-linijski potencijal, pokazano je da samo nekoliko populacija progenitorskih ćelija ima sposobnost naseljavanja timusa (Yang i sar. 2010). Ove ćelije odlikuje različit proliferativni potencijal i različit stepen linijskog usmeravanja (Saran i sar., 2010). Različitim proliferativnim potencijalom kao i različitom dinamikom diferencijacije ovih ćelija u timusu moglo bi se objasniti kontinuirano odvijanje procesa timopoeze, uprkos podacima koji ukazuju na to da je naseljavanje timusa strogo kontrolisan proces koji se, kod miša, dešava u „talasima“, odnosno u vremenskim intervalima od 3-5 nedelja (Foss i sar., 2001, Donskoy i sar., 2003, Goldschneider, 2006; Saran i sar., 2010).

Limfoidni progenitori ulaze u timus putem venula sa visokim endotelom u predelu KMZ (Lind i sar., 2001). Ovaj proces koordinira čitav niz molekula od kojih su najvažnije: receptor za hemokin sa C-X-C motivom tipa 4 (engl. C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR-4), receptor za hemokin sa C-C motivom tipa 9 (engl. C-C chemokine receptor type 9, CCR9) i adhezivne molekule (P-selektin i CD44) ispoljene na stromalnim ćelijama timusa (Sitnicka, 2009, Kenins i sar., 2010).

Tokom procesa diferencijacije/sazrevanja timocita na površini ovih ćelija dolazi do ispoljavanja karakterističnih konstelacija površinskih molekula, što omogućava razdvajanje populacija timocita u različitim fazama razvoja. Tako najnezrelije timocite karakteriše odsustvo CD4 i CD8 koreceptorskih molekula, pa se ove ćelije označavaju kao **dvostruko negativne (DN)**. Najnezrelije ćelije u populaciji DN timocita ne ispoljavaju ni TCR, pa se nazivaju **trostruko negativnim (TN)** ćelijama (Zúñiga-Pflucker i Lenardo, 1996).



Kod čoveka i miša, nejnezreliji, **TN** timociti, mogu se, na osnovu ekspresije CD44, c-kit (CD117) i CD25 ( $\alpha$  lanac receptora za interleukin-2) podeliti na 4 subpopulacije koje predstavljaju **TN** ćelije u različitim razvojnim stadijumima **DN1-DN4** (Godfrey i sar., 1993).

**DN1** populacija timocita je veoma heterogena, a ćelije sa visokim nivoom ekspresije c-kit (c-kit++) u okviru ove populacije najefikasnije se diferenciraju u T-ćelije. **DN1** timociti ispoljavaju i CD44, ali ne i CD25 molekul i nazivani su **rani T-ćelijski progenitori** (engl. early T-lineage progenitors, ETP) (Allman i sar., 2003). Odlikuje ih izrazito visok proliferativni potencijal, pa se ove ćelije (iako čine svega 0.01% ukupne populacije timocita) smatraju najefikasnijim prekursorima T-ćelija u timusu (Yang i sar., 2010). U ovoj populaciji, pored ćelija koje imaju visok T-linijski potencijal, mogu se naći i ćelije koje mogu da se diferenciraju i u B-limfocite, NK, kao i timusne DC (Borowski i sar., 2002, Bell i Bhandoola, 2008). U KMZ **DN1** timociti ostvaruju blizak kontakt sa ćelijama strome timusa koje im obezbeđuju signale neophodne za preživljavanje, proliferaciju i dalju diferencijaciju. U te signale se ubrajaju: IL-7 (Akashi i sar., 1998), faktor matičnih ćelija (engl. stem cell factor, SCF) ili ligand za c-kit (c-KitL) (Agosti i sar., 2004), kao i članovi Wnt familije proteina (Wnt1 i Wnt4) (Staal i sar., 2001, Staal i sar., 2004). Tokom **DN1** faze razvoja timociti iz KMZ migriraju ka unutrašnjem korteksu (Lind i sar., 2001; Porritt i sar., 2003; Petrie i Zuniga-Pflucker, 2007).

Daljom diferencijacijom **DN1** ćelije gube sposobnost diferencijacije u B-ćelije, ali zadržavaju sposobnost diferencijacije u NK i DC (Bell i Bhandola, 2008) i zadobijaju fenotip karakterističan za **DN2** timocite. Za njihovo usmeravanje ka T-ćelijskoj liniji ključna je interakcija molekula koji pripadaju Notch familiji proteina eksprimiranih na membrani **DN2** timocita sa njihovim ligandima (Jagged 1 i Delta 1-3 molekulima) eksprimiranim na ćelijama timusne strome (Harman i sar., 2003; Radtke i sar., 2004). Prenos signala posredstvom Notch transmembranskih proteina dovodi do aktivacije ekspresije niza gena neophodnih za linijsko usmeravanje T-ćelija (Yang i sar., 2010). Timociti na ovom stadijumu ispoljavaju CD44 i c-Kit molekul, a počinju da ispoljavaju i CD25, kao i intracelularni adhezivni molekul (engl. intracellular adhesive molecule-1, ICAM-1).

Prelazak timocita u naredni stadijum diferencijacije/sazrevanja dešava se uporedo sa njihovom migracijom ka subkapsularnoj zoni. Pokazano je da su za ovaj proces ključni CXCR4, receptor za hemokin sa C-C motivom tipa 7 (engl. C-C chemokine receptor type 7, CCR7) i CCR9, poreklom od ćelija strome timusa (Takahama, 2006). Timociti na **DN3** razvojnom stadijumu smanjuju ekspresiju CD44 i c-Kit molekula, a povećavaju ekspresiju CD25 (Bommhardt i sar., 2004). Paralelno sa tim, dolazi do usporavanja proliferacije timocita i inicijacije procesa rekombinacije gena za  $\beta$  lanac TCR (Bommhardt i sar., 2004). Rearanžman gena za  $\beta$  lanac TCR događa se pre rearanžmana gena za  $\alpha$  lanac i neophodan je za dalju diferencijaciju/sazrevanje timocita. Najpre se odvija  $D\beta$ - $J\beta$  rearanžman oba alela TCR- $\beta$  genskog lokusa, a zatim  $V\beta$ - $D\beta J\beta$  rearanžman pojedinačnih alela (Capone i sar., 1998, Livak i sar., 1999). Rekombinaciju ovih genskih segmenata vrše enzimi rekombinaze koje aktiviraju produkti RAG-1 i RAG-2 gena (engl. recombinase activating gene, RAG) (Rossi i sar., 2006). Zajedno sa  $\beta$  lancem, eksprimira se surogat  $\alpha$  lanca- pre-T $\alpha$  lanac, koji sa CD3  $\delta$ ,  $\epsilon$  i  $\gamma$  molekulima formira pre-TCR kompleks na membrani timocita (Killeen i sar., 1998, Bommhardt i sar., 2004). Samo one ćelije koje su uspešno rearanžirale gen za TCR- $\beta$  i ispoljile ga na membrani u kombinaciji sa pre-T $\alpha$ , gradeći pre-TCR kompleks, dobijaju signal za preživljavanje i „prolaze“ tzv.  $\beta$ -selekciju (Michie i Zuniga-Pflucker, 2002; Bommhardt i sar., 2004, Zamoyska i Lovatt, 2004). Sprovođenje signala posredstvom pre-TCR zaustavlja dalju rekombinaciju TCR- $\beta$  genskog lokusa, odnosno dovodi do alelske ekskluzije (Killeen i sar., 1998, Bommhardt i sar., 2004). Uspešan rearanžman i ekspresija pre-TCR obezbeđuje signal koji je neophodan za preživljavanje **DN3** timocita, kao i za dalju diferencijaciju ovih ćelija u **DN4** timocite, odnosno **kasne pre-T-ćelije**. **DN4** razvojni stadijum karakteriše smanjenje ekspresije CD25 molekula i intenzivna proliferacija ćelija, koje su u ovoj razvojnoj fazi lokalizovane u subkapsularnoj zoni timusa (Michie i Zuniga-Pflucker, 2002). Sprovođenje signala posredstvom pre-TCR utiče i na ekspresiju nekoliko transkripcionih faktora, što dovodi do prekida proliferacije i preuređenja gena za  $\alpha$  lanac TCR (Xi i sar., 2006). Novosintetisani  $\alpha$  lanac TCR zamenjuje pre-T $\alpha$  (Zuniga-Pflucker i Lenardo, 1996), što uvodi ćeliju u kasni (TCR zavisni) stadijum diferencijacije/sazrevanja. Ovaj proces je katalizovan produktom RAG-2 gena (Bommhardt i sar., 2004).

Za razliku od čoveka i miša, kod pacova se u populaciji najnezrelijih, **TN** timocita

moгу razdvojiti tri subpopulacije, koje odlikuje različita ekspresija CD2 molekula i teške izoforme CD45R molekula (engl. protein tyrosine phosphatase, receptor type C, PTPRC) na membrani ćelija. Na osnovu regenerativne sposobnosti i proliferativnog potencijala ćelija koje pripadaju različitim subpopulacijama TN timocita, pretpostavljeni su sledeći razvojni koraci: CD45RC+CD2-, CD45RC+CD2+, CD45RC-CD2+ (Law i sar., 1989; Hünig i sar., 2001). T-limfociti ponovo započinju ekspresiju teške izoforme CD45R molekula približno nedelju dana nakon napuštanja timusa (Hünig i sar., 2001).

### ***1.2.2. Kasni (TCR zavisni) stadijum diferencijacije/sazrevanja timocita***

Nakon ekspresije TCR $\alpha\beta$  timociti prolaze kroz dva kontrolna procesa, pozitivnu i negativnu selekciju, koji su neophodni za formiranje imunokompetentnog repertoara T-ćelija, tj. ćelija koje prepoznaju strane ili izmenjene sopstvene peptide iskazane u sklopu sopstvenih MHC molekula (Hoquist i sar., 2005). Selekcioni procesi se ostvaruju kroz interakcije timocita sa ćelijama timusne mikrosredine, vezivanjem TCR $\alpha\beta$ , CD4 i CD8 koreceptorskih molekula za sopstveni peptid/MHC kompleks (p/MHC) eksprimiran na stromalnim ćelijama timusa.

#### ***1.2.2.1. Pozitivna selekcija***

**Pozitivna selekcija** je proces tokom koga se testira sposobnost TCR $\alpha\beta$  T-ćelija da prepoznaju kompleks sopstveni p/MHC. Ovaj proces ima za posledicu preživljavanje samo onih ćelija čiji TCR kompleks uspostavlja interakciju umerenog afiniteta/aviditeta, sa kompleksima sopstveni p/MHC eksprimiranim na ćelijama timusne strome (Hogquist i sar., 2005).

Nakon rearanžmana  $\alpha$  lanca TCR timociti ispoljavaju koreceptorske molekule i zadobijaju fenotip koji karakteriše prisustvo oba koreceptora i niska ekspresija TCR $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta^+$ ) i ove ćelije se označavaju kao  **dvostruko pozitivni (DP)**  timociti (Zamoyska i Lovatt, 2004). Na ovom stadijumu diferencijacije/sazrevanja timociti se odlikuju izrazitom pokretljivošću, a budući da i dalje eksprimiraju visok nivo RAG rekombinaze, tokom narednih nekoliko dana (3-4 dana), ove ćelije stupaju u interakciju sa velikim

brojem stromalnih ćelija timusa „tražeći“ odgovarajući kompleks sopstveni p/MHC uz istovremeno „isprobavanje“ različitih kombinacija  $\alpha$  lanca TCR (Bousso i sar., 2002; Witt i Robey, 2005). Nakon uspostavljanja odgovarajuće interakcije TCR $\alpha\beta$  timocita i kompleksa sopstveni p/MHC na ćelijama timusne strome, timociti se zaustavljaju (Bhakta i Lewis, 2005). Ukoliko je interakcija TCR kompleksa i kompleksa sopstveni p/MHC umerenog afiniteta/aviditeta signali koji se prenose posredstvom TCR dovode do zaustavljanja ekspresije *RAG* gena i povećanja ekspresije TCF-1 (transkripcionog faktora Wnt signalnog puta), koji regulacijom ekspresije steroidnog transkripcionog faktora ROR $\gamma$  povećava ekspresiju anti-apoptotskog faktora Bcl-X<sub>L</sub> u timocitima (Yuan i sar., 2010). U odsustvu transkripcione aktivnosti TCF-1 ili ROR $\gamma$  nema ekspresije Bcl-X<sub>L</sub> i timociti umiru usled „zanemarivanja“ (engl. death by neglect) (Minter i Osborne, 2003). Na ovom razvojnem stadijumu, samo 3-5% timocita preživi i nastavlja dalju diferencijaciju/sazrevanje (Egerton i sar., 1990; Goldrath i Bevan, 1999).

Međutim, ukoliko je interakcija između TCR i kompleksa sopstveni p/MHC visokog afiniteta/aviditeta moguća su dva ishoda: pokretanje signalnog puta programirane ćelijske smrti timocita ili indukcija ćelija regulatornog fenotipa (Hoquist i sar., 2005). Prvi ishod je u literaturi označen kao **negativna selekcija** i doprinosi eliminaciji potencijalno autoreaktivnih T-limfocita, dok se proces koji ima za posledicu nastanak regulatornih ćelija naziva **selekcija agonistom**.

Činjenica da je interakcija kompleksa TCR i kompleksa sopstveni p/MHC neophodna za preživljavanje i linijsko opredeljenje timocita, ali može indukovati i apoptozu ćelija (kroz proces negativne selekcije), ili formiranje regulatornih T-limfocita, uprkos brojnim istraživanjima, do danas ostaje u velikoj meri nerazjašnjen fenomen, koji se u literaturi označava kao **selekcioni paradoks** (Klein i sar., 2009). Nekoliko modela je predloženo sa ciljem pružanja objašnjenja ovog fenomena: **model izmenjenih peptida; kinetički, model aktivacionog praga, aviditetni i afinitetni model**, od kojih su **aviditetni i afinitetni model** potkrepljeni sa najvećim brojem eksperimentalnih dokaza. **Afinitetni model** podrazumeva da ligandi koji se sa niskim afinitetom vezuju za TCR kompleks promovišu pozitivnu selekciju timocita, dok ligandi koji se visokim afinitetom vezuju za TCR dovode do njihove negativne selekcije (Starr i sar., 2003). S obzirom na podatke koji ukazuju da „sudbina“ DP timocita zavisi od gustine ekspresije liganda na nelimfoidnim ćelijama, usvojen je izmenjeni

**afinitetno/aviditetni model** selekcije koji je danas najšire prihvaćen (Williams i sar., 1997; Klein i Kyewski, 2000). Međutim, ovaj model za sada pruža objašnjenje samo za mehanizam procesa selekcije konvencionalnih efektorskih T-ćelija, ali ne pruža objašnjenje za mehanizam indukcije regulatornih T-ćelija kao ni objašnjenje za prostornu i vremensku dimenziju procesa selekcije u timusu.

Naime, pokazano je da se proces diferencijacije/sazrevanja timocita odvija kroz veoma uređen prolazak timocita kroz različite mikrosredine timusa, pa se logično postavlja pitanje da li različite karakteristike pojedinih ćelija strome timusa, zajedno sa različitom prirodom peptida iskazanih u kompleksu sa molekulima MHC na ovim ćelijama, predstavljaju ključne faktore u određivanju sudbine timocita (Klein i sar., 2009). Novijim istraživanjima pokazano je da TEC prerađuju peptide koji će biti iskazani u kontekstu sa MHC molekulima drugačije od ostalih timusnih ili perifernih APC i da je upravo ekspresija takvih proteina na TEC neophodna za uspostavljanje optimalnog repertoara specifičnosti T-limfocita (Murata i sar., 2007; Gommeaux i sar., 2009). Tako je pokazano da kTEC poseduju specifične komponente enzimske mašinerije kao što su: katepsin L i timus-specifične serin proteaze (engl. thymus specific protease, TSSP) za obradu peptida koji će biti iskazani u sklopu MHC molekula II klase (Nakagawa i sar., 1998, Honey i sar., 2002; Gommeaux i sar., 2009), kao i sposobnost makroautofagije, zahvaljujući kojoj uključuju intracelularne proteine u put obrade liganada za MHC molekule II klase (Nedjic i sar., 2009). Otkrićem subjedinične proteazoma  $\beta 5t$ , čije je prisustvo utvrđeno samo u kTEC, pokazano je da se izmenjena obrada proteina u kTEC dešava i kada su u pitanju ligandi za MHC molekule I klase (Murata i sar., 2007).

Prenos signala posredstvom TCR dovodi do ekspresije molekula neophodnih za preživljavanje timocita, kao što su Bcl-2 i  $\alpha$  subjedinična receptora za IL-7, kao i molekula potrebnih za migraciju timocita u timusnu medulu, kao što je CCR7 (receptor za hemokine CCL19 i CCL21) (Takahama, 2006; Wang i sar., 2010).

#### ***1.2.2.2. Linijsko usmeravanje***

Tokom procesa pozitivne selekcije timociti primaju signale neophodne za preživljavanje i dalju diferencijaciju/sazrevanje što ima za posledicu povećanje

ekspresije TCR, kao i niz fenotipskih i funkcionalnih promena koje prethode nastanku CD4+CD8- ili CD4-CD8+ **jednostruko pozitivnih (JP)** ćelija, prethodnika T-limfocita sa primarno pomoćničkom (CD4+), odnosno citotoksičnom (CD8+) funkcijom. Nasuprot ranijem mišljenju da pozitivno selektovani timociti smanjuju - „gase“ ekspresiju jednog od koreceptorskih molekula, novijim istraživanjima pokazano je da se tokom prelaska iz **DP** u **JP** razvojni stadijum smanjuje ekspresija CD8 koreceptorskog molekula, bez obzira da li je ćelija predodređena da postane CD4+CD8- ili CD4-CD8+ **JP**, pri čemu nastaje zajednički prelazni stadijum (He i sar., 2010). Tokom narednog stadijuma timociti koji su predodređeni da postanu CD4+CD8- **JP** dalje smanjuju ekspresiju CD8 molekula, dok buduće CD4-CD8+ **JP** ćelije prolaze kroz dva prelazna stadijuma (CD4+/- CD8+/- i CD4+/- CD8+/+) pre nego što postanu zreli CD4-CD8+ **JP** timociti (Kydd i sar., 1995; Lucas i Germain, 1996). Ovo razdvajanje na dve ćelijske linije tokom procesa sazrevanja timocita naziva se linijsko usmeravanje (Kisielow i sar., 1988; Kaye i sar., 1992).

Mehanizmi koji leže u osnovi ovog fenomena već dugo su predmet intenzivnih istraživanja. Predloženo je nekoliko modela koji objašnjavaju ovaj proces od kojih su **instruktivni, stohastično-selekcioni i kvantitativni instruktivni model** bili najšire prihvaćeni. Međutim, saznanje da linijsko usmeravanje nije završeno do intermedijernog stadijuma kojeg karakteriše ekspresija oba koreceptorska molekula (Brugnera i sar., 2000) dalo je osnovu za postavljanje još jednog modela, **modela kinetičke signalizacije**. Prema ovome modelu, linijsko usmeravanje je posledica razlika u intenzitetu i dužini trajanja signala koji se prenose posredstvom TCR, pa tako signalizacija slabijeg intenziteta, ili prekid signalizacije dovode do usmeravanja ka CD4-CD8+ **JP**, dok kontinuirana signalizacija ili signali jačeg intenziteta vode usmeravanju ka CD4+CD8- **JP** timocitima (Brugnera i sar., 2000; Liu i Bosselut, 2004). Transkripcioni faktori GATA-3 (engl. trans-acting T-cell-specific transcription factor, GATA-3) i Runx3 (engl. runt-related transcription factor 3, Runx3) imaju značajnu ulogu u regulaciji ovog procesa. Pokazano je naime da konstitutivna ekspresija GATA-3 sprečava sazrevanje CD4-CD8+ **JP** timocita, dok deficit ovog transkripcionog faktora blokira nastanak CD4+CD8- **JP** timocita (Nawijn i sar., 2001; Hernandez-Hoyos i sar., 2003). Pored toga, kao važan faktor za opredeljenje ka CD4+CD8- **JP** timocitima tokom pozitivne selekcije, nishodno od GATA-3, identifikovan je transkripcioni faktor

Thpok (Wang i sar., 2010). Runx faktori igraju značajnu ulogu u regulaciji sazrevanja CD4-CD8+ **JP** timocita, ali posredno, kontrolišući ekspresiju CD4 kostimulatornog molekula (Grueter i sar., 2005), budući da je pokazano da smanjena ekspresija CD4 kostimulatornog molekula uzrokuje preusmeravanje timocita čiji je TCR specifičan za MHC molekule II klase ka CD4-CD8+ **JP** timocitima, slabljenjem signala koji se prenose posredstvom TCR (Matechaki i sar., 1996; Tyznik i sar., 2004).

### ***1.2.2.3. Negativna selekcija***

Nakon pozitivne selekcije timociti migriraju u medulu, gde borave još 4-5 dana pre nego što dobiju „dozvolu“ za izlazak iz timusa (McCaughtry i sar., 2007). Brojni eksperimentalni nalazi upućuju na to da se u meduli timusa, kroz interakcije timocita sa medularnim APC, prevashodno mTEC i DC dešava „kontrola kvaliteta“ timocita. Naime, tokom boravka u meduli dešavaju se procesi neophodni za uspostavljanje tolerancije timocita na sopstvene antigene i to: **recesivne tolerancije** koja se odvija kroz eliminaciju autoreaktivnih timocita i **dominantne tolerancije** koja se odvija kroz indukciju regulatornih ćelija u timusu (Hogquist i sar., 2005; Klein i sar., 2009).

Glavni mehanizam **recesivne**, centralne tolerancije je **klonska delecija**, indukcija apoptoze timocita čiji TCR koji sa visokim afinitetom/aviditetom intereaguju sa ligandima na stromalnim ćelijama timusa (Starr i sar., 2003; Hogquist i sar., 2005). Pored ovog, postoje i drugi mehanizmi **recesivne** centralne tolerance, kao što su **klonska anergija** ili inaktivacija potencijalno autoreaktivnih klonova timocita (Hammerling i sar., 1991) i **preuređivanje receptora** (engl. receptor editing), tokom kojeg timociti dobijaju signal koji omogućava ponovno preuređenje gena za TCR $\alpha$  (McGargill i sar., 2000; Mayerova i Hogquist, 2004). Međutim, smatra se da je učešće ovih mehanizama u formiranju repertoara specifičnosti T-limfocita, ipak zanemarljivo (Hogquist i sar., 2005).

Iako postoje podaci koji ukazuju na to da se eliminacija timocita koji sa visokim afinitetom/aviditetom prepoznaju komplekse sopstveni p/MHC na stromalnim ćelijama timusa može dogoditi i u korteksu (Hogquist i sar., 2005), vremenski čak i pre pozitivne selekcije (Douek i sar., 1996; von Boehmer i Kieselow, 2006), smatra se da je migracija timocita u medulu neophodna za uspostavljanje tolerancije timocita na sopstvene

antigene (Ueno i sar., 2004).

Pozitivno selektovani timociti u meduli susreću se sa većim brojem ćelija, od kojih su najvažnije mTEC i DC, koje kao profesionalne APC na membrani konstitutivno eksprimiraju MHC molekule I i II klase (Kyewski i sar., 2002; Hogquist i sar., 2005) i veći broj kostimulatornih molekula CD86, CD80, CD5, CD28, CD40, CD152 i CD155 (Hogquist i sar., 2005; Qui i sar., 2010).

Ključna odlika ćelija timusne medule je sposobnost prezentacije velikog broja tkivno specifičnih antigena (engl. tissue specific antigen, TSA). Ispoljavanje TSA je, u najvećoj meri, pod kontrolom transkripcionog faktora koji je produkt autoimunskog regulatornog elementa (engl. autoimmune regulator, AIRE) (Derbinski i sar., 2001; Anderson i sar., 2002; Kyewski i Klein, 2006). Deficijencija gena za AIRE ima za posledicu gubitak organ-specifične tolerancije, i razvoj sindroma autoimunske poliendokrinopatije tip 1 (APEX) (Zamoyska i Lovatt, 2004; Liu, 2006). Iako je učestalost mTEC koje ispoljavaju određeni TSA izuzetno niska, a do zamene zrelih mTEC dolazi svake ili svake 2 nedelje (Gabler i sar., 2007; Gray i sar., 2007), smatra se da dugačak boravak u timusnoj meduli i izrazita pokretljivost, omogućavaju zrelim timocitima da ostvare kontakt sa velikim brojem mTEC i/ili sa antigenima poreklom iz mTEC iskazanim na DC, odnosno da „testiraju“ sposobnost prepoznavanja velikog broja TSA (Klein i sar., 2001). Pored toga, povećanju raznovrsnosti antigena koji su prezentovani medularnim timocitima, doprinosi i različito poreklo timusnih DC. Budući da je pokazano da deo timusnih DC čine i ćelije koje u timus dospevaju putem cirkulacije-migratorne DC, smatra se da ove ćelije prezentuju periferne antigene koje ne ispoljavaju mTEC (Kyewski i sar., 2002; Zamoyska i Lovatt, 2004; Liu, 2006; Klein i sar., 2009).

Timociti koji su prošli proces negativne selekcije smanjuju ekspresiju aktivacionih molekula (CD24 i CD69), a povećavaju ekspresiju molekula neophodnih za izlazak iz timusa, adhezivnih molekula (CD62L) kao i CCR7 hemokinskog receptora (Matloubian i sar., 2004; Ueno i sar., 2004). Pre izlaska na periferiju, ove ćelije prolaze kroz još jedan „talas“ proliferacije (Penit i Vasseur, 1997; Le Campion i sar., 2000). Izlazak zrelih timocita na periferiju je aktivan proces koji kontrolišu signali posredovani receptorima za sfingozin-1-fosfat (engl. sphingosine-1-phosphate, S1P) tipa 1 (S1P<sub>1</sub>)



(Weinreich i Hogquist, 2008).

Kinetička studija je pokazala da se izlazak zrelih timocita dešava približno 12 dana ulaska progenitorskih ćelija u timus, kao i da timus dnevno napušta oko 1% od ukupnog broja timocita (Anderson i sar., 1999).

#### ***1.2.2.4. Selekcija agonistom***

Kao što je prethodno navedeno, pored indukcije apoptoze, klonske anergije i preuređenja gena za TCR, ishod interakcije visokog afiniteta/aviditeta TCR kompleksa sa svojim ligandima na stromalnim ćelijama timusa može biti i diferencijacija timocita u ćelije sa značajnom funkcijom u regulaciji imunskog odgovora. Ovaj proces, koji se još naziva **selekcija agonistom** (Baldwin i sar., 2004) ili **nedeleciona tolerancija** (Liu, 2006) dovodi do stvaranja ćelija posebnih fenotipskih i funkcionalnih karakteristika. Ove ćelije uključuju: ćelije koje ispoljavaju FoxP3 (engl. forkhead box P3, FoxP3) transkripcioni faktor; invarijantne ćelije koje su povezane sa mukozama (engl. mucosal associated invariant T cells, MAIT); intestinalne epitelne ćelije koje ispoljavaju CD8 $\alpha$  i NKT ćelije (Hogquist i sar., 2005; Josefowicz i Rudensky, 2009; Bettini i Vignali, 2010). Iako ćelije koje pripadaju svim ovim subpopulacijama ispoljavaju imunomodulatorne karakteristike, smatra se da su jedino ćelije koje ispoljavaju FoxP3 transkripcioni faktor, pravi medijatori **dominantne tolerancije** kritične za održavanje homeostaze imunskog sistema (Josefowicz i Rudensky, 2009).

##### ***1.2.2.4.1. Regulatorne T-ćelije***

Ćelije fenotipa CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> su prvobitno identifikovane kao jedinstvena populacija ćelija koja sprečava aktivaciju autoreaktivnih T-limfocita u nizu eksperimentalnih modela autoimunskih bolesti (Sakaguchi i sar., 1995). Ova populacija ćelija je kasnije okarakterisana i ekspresijom FoxP3 transkripcionog faktora (Hori i Sakaguchi, 2004), koji je ključni regulator nastanka i održavanja transkripcionog programa i fenotipa regulatornih ćelija (engl. regulatory T-cells, Treg) (Hori i Sakaguchi, 2004; Sakaguchi i sar., 2008). Mutacija u FOXP3 genu kod ljudi dovodi do

sindroma povezanog sa X hromozomom koji uključuje imunsku disregulaciju, poliendokrinopatiju, enteropatiju (engl. immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome, IPEX) (Bennett i sar., 2001).

Generalno govoreći Treg se mogu podeliti na dve populacije ćelija različitog porekla, specifičnosti i efektorskih mehanizama delovanja. Prva populacija su ćelije koje nastaju u timusu i označavaju se kao prirodne ili urođene Treg (engl. natural regulatory T cells, nTreg). Druga populacija su adaptivne ili inducibilne Treg (engl. inducible regulatory T cells, iTreg) i nastaju aktivacijom zrelih konvencionalnih T-limfocita na periferiji pod specifičnim uslovima suboptimalnog izlaganja antigenima i/ili kostimulaciji (Curotto de Lafaille i Lafaille, 2009; Josefowicz i Rudensky, 2009).

Osnovna razlika između nTreg i iTreg leži u njihovoj antigenskoj specifičnosti. Prirodne, nTreg specifične su za sopstvene antigene, dok iTreg antigenu specifičnost „crpe“ iz repertoara naivnih konvencionalnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita (Curotto de Lafaille i Lafaille, 2009). U pogledu njihove funkcije za sada postoji konsenzus mišljenja da nTreg prvenstveno deluju tako što sprečavaju da dođe do aktivacije autoreaktivnih T-ćelija, dok iTregs deluju nakon njihove aktivacije konvertujući ih u supresorske ćelije (Jaeckel i sar., 2006, DiPaolo i Shevach, 2009). Budući da još nisu utvrđeni odgovarajući ćelijski markeri koji bi razdvojili nTreg ćelije i iTreg, njihov pojedinačan doprinos populaciji Treg u sekundarnim limfoidnim organima i nelimfoidnim tkivima, kako u fiziološkim uslovima, tako i u uslovima patologije imunskog sistema, ostaje u velikoj meri nejasan.

U ovom trenutku nije poznato da li nTreg nastaju u timusu kao sasvim odvojena ćelijska linija ili tokom selekcije timocita bilo koji DP timocit može da se diferencira u nTreg. Međutim, nedvosmisleno je pokazano da je za stvaranje nTreg neophodan prenos signala karakteristične jačine posredstvom TCR (Rezzani i sar., 2008). Selekcija nTreg omogućena je interakcijom timocita sa TCR većeg afiniteta za sopstveni p/MHC II klase nego što je potrebno za selekciju konvencionalnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita, ali ipak nižeg od onog koji dovodi do negativne selekcije ovih ćelija (Fehervari i Sakaguchi, 2004; Josefowicz i Rudensky, 2009). Na osnovu novijih istraživanja predložen je dvostepeni model nastanka nTreg (Lio i Hsieh, 2008). Prema ovom modelu, tokom faze instrukcije, jak signal koji se prenosi preko TCR ima za posledicu smanjenje ekspresije

CD25 molekula, što povećava osetljivost ovih ćelija, prekursora nTreg za IL-2. Faza konsolidacije nastupa u timusnoj meduli, gde delovanje IL-2, kao i kostimulatorni molekuli dovode do aktivacija STAT 5 (engl. signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) signalnog puta, što omogućava preživljavanje ovih ćelija i ekspresiju FoxP3 transkripcionog faktora (Burchill i sar., 2008, Lio i Hsieh, 2008). Pored signala koji se prenose posredstvom TCR za nastanak nTreg neophodan je i čitav niz kostimulatornih signala, u prvom redu vezivanje CD28 za CD80/CD86 molekule stromalnih ćelija, kao i signalizacija posredstvom CD154 (liganda za CD40 kostimulatorni molekul) i glukokortikoidima indukovano receptora za faktor nekroze tumora (engl. glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR) (Bettini i Vignali, 2009).

Pored intracelularnih molekula, kakav je FoxP3 (Hori i Sakaguchi, 2004, Lan i sar., 2005), većina Treg konstitutivno eksprimira i brojne površinske molekule: CD25, GITR (engl. glucocorticoid-induced TNFR-related protein, GITR), CTLA-4 (engl. cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4), galaktin-1, LAG-3 (engl. lymphocyte activation gene 3, LAG-3), CD38, CD62L, CD252, CD103, TNF receptor 2, TGF- $\beta$  receptor 1, CD5 i L-selektin (Hori i Sakaguchi, 2004, Lan i sar., 2005).

Svoje regulatorno delovanje Treg ostvaruju produkcijom antinflatornih citokina ili direktnim kontaktom sa efektorskim limfocitima i/ili APC, čime suprimiraju njihovu aktivaciju i funkciju (Shevach, 2009). Sve više je studija koje upućuju na to da Treg, pored supresije autoreaktivnih T-ćelija, učestvuju i u modulaciji zapaljenskih reakcija, odgovora na infekciju, kao i antitumorskog imunskog odgovora (Curotto de Lafaille i Lafaille, 2009; Josefowicz i Rudensky, 2009).

#### **1.2.2.4.2. NKT ćelije**

NKT ćelije obuhvataju više subpopulacija T-limfocita različitih fenotipskih i funkcionalnih karakteristika koje odlikuje ekspresija TCR ograničene varijabilnosti i ekspresija receptora karakterističnih za NK ćelije (Sykes, 1990, Gumperz i sar., 2002). Najveći broj NKT ćelija poseduje TCR koji prepoznaje strane ili sopstvene glikolipidne antigene iskazane u kompleksu sa molekulima sličnim MHC molekulima, CD1 molekulima. Prema do danas dostupnim saznanjima, NKT ćelije miša se mogu podeliti

na najmanje tri subpopulacije: 1) klasične (invarijantne), NKT ćelije I klase ekspimiraju invarijantni  $\alpha$  lanac (TCR $\alpha$ ; V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 kod miša, V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 kod čoveka) TCR- $\alpha$  u kombinaciji sa određenim  $\beta$  lancima (V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 or V $\beta$ 2 kod miša, V $\beta$ 11 kod čoveka) i prepoznaju glikosfingolipidne antigene (engl.  $\alpha$ -galactosylceramide,  $\alpha$ -GalCer) u kompleksu sa CD1d molekulom; 2) NKT ćelije II klase koje ekspimiraju  $\alpha$  lanac TCR, veće varijabilnosti i prepoznaju hidrofobne antigene (sulfatidi, lizofosfatidilholini) u kompleksu sa CD1d molekulom i 3) ćelije slične NKT ćelijama koje ekspimiraju delimično invarijantni TCR, a ne prepoznaju antigene u kompleksu sa CD1 molekulima (Godfrey i Berzins, 2007). Najveći broj NKT ćelija I klase i II klase, kao i sve ćelije slične NKT ćelijama, ispoljavaju receptor karakterističan za NK ćelije (NK1.1) (Godfrey i Berzins, 2007). Najbolje okarakterisana populacija NKT ćelija je populacija klasičnih NKT ćelija, mada je pokazano da u pojedinim modelima bolesti važniju ulogu imaju NKT ćelije II klase (Berzofsky i Terabe, 2008).

Iako NKT ćelije predstavljaju malobrojnu populaciju T-limfocita, njihova sposobnost da nakon antigene stimulacije veoma brzo proizvode velike količine citokina, čini ih važnim modulatorima imunskog sistema (Kronenberg i Gapin, 2002, Bendelac i sar., 2007). Ove ćelije imaju važnu ulogu u borbi protiv patogena, supresiji tumora, prevenciji autoimunskih bolesti, kao i uspostavljanju i održavanju tolerancije na alotransplante (Godfrey i Berzins, 2007).

NKT ćelije nastaju uglavnom u timusu, i novija istraživanja upućuju na to da NKT ćelije dele rane stadijume diferencijacije sa konvencionalnim efektorskim T-ćelijama, i da se od zajedničkog prekursora odvajaju na DP stadijumu diferencijacije u timusnom korteksu (Gapin i sar., 2001, Egawa i sar., 2005). Smatra se da se DP timociti, koji ispolje delimično invarijantni TCR, nakon interakcije sa CD1d molekulima „opredele“ ka NKT ćelijskoj liniji (Bendelac, 1995). Za razliku od konvencionalnih T-ćelija, za čiju je pozitivnu selekciju potrebna interakcija sa kompleksom sopstveni p/MHC iskazanim na ćelijama timusne strome, za selekciju NKT ćelija neophodna je interakcija sa CD1d molekulima iskazanim na kortikalnim DP timocitima (Bendelac, 1995, Godfrey i sar., 2010). Treba istaći da je pokazano da se NKT ćelije kod miša (ali ne i kod čoveka) dugo zadržavaju u timusu (Berzins i sar., 2006), što nameće pitanje njihove funkcije. Postoje nalazi koji upućuju na to da ove ćelije učestvuju u deleciji aloreaktivnih T-limfocita, što sugeriše njihovu ulogu u finoj

regulaciji negativne selekcije konvencionalnih T-ćelija (Iwai i sar., 2006).

Iako se smatra da većina NKT ćelija nastaje u timusu, pojedini nalazi ukazuju na to da kod miša NKT ćelije mogu nastati i nezavisno od timusa, u jetri i slezini (Makino i sar., 1993; Sato i sar., 1995).

Nakon izlaska iz timusa, u tkivno specifičnim uslovima, NKT ćelije se diferenciraju u funkcionalno različite ćelije. Kod miša, u okviru populacije ćelija koja ispoljava TCR i NK1.1 marker, mogu se naći CD4+ i CD4-CD8- DN ćelije, dok su kod čoveka u ovoj populaciji prisutne i CD8+ ćelije, koje se od konvencionalnih citotoksičnih T-limfocita razlikuju ekspresijom  $\alpha$  homodimera koreceptorskog molekula (Lee i sar., 2002, Godfrey i Berzins, 2007). Kod pacova, za razliku od miša i čoveka, oko 80% NKT ćelija ispoljava CD8 koreceptorski molekul (Matsuura i sar., 2000).

TCR koji ispoljavaju NKT ćelije prepoznaje komponente ćelijskog zida mikroba, koji, pretpostavlja se, promiču klasičnim receptorima za prepoznavanje molekulskih obrazaca (Taniguchi i sar., 2003). Shodno tome, smatra se da ove ćelije predstavljaju vezu između urođenog i adaptivnog imuniteta.

### ***1.3. Sveži timusni emigranti***

Nakon izlaska iz timusa novoformirane T-ćelije, koje se u literaturi označavaju kao sveži timusni emigranti (engl. recent thymic emigrants, RTE), svoje sazrevanje završavaju u perifernim limfoidnim organima (Houston i sar., 2011). Tokom ovog procesa, koji traje i nekoliko nedelja, ćelije se fenotipski menjaju i funkcionalno sazrevaju kako bi postale deo populacije naivnih T-ćelija (Houston i sar., 2011). Njihovo preživljavanje na periferiji zavisi od brojnih faktora, među kojima je najkritičnije prisustvo IL-7 kao i kontakt sa kompleksom sopstveni p/MHC ispoljenim na ćelijama strome sekundarnih limfoidnih organa (Surh i Sprent, 2008).

Novoformirane ćelije kod miša i čoveka fenotipski se veoma teško mogu razlikovati od zrelih naivnih ćelija. Za razliku od miša i čoveka, pokazano je da se kod pacova T-limfociti na različitim stadijumima sazrevanja mogu razlikovati na osnovu ekspresije Thy-1 (CD90) i CD45R molekula (Hosseinzadeh i Goldschneider, 1993). Zajednički leukocitni antigen CD45R može biti ispoljen u nekoliko formi u zavisnosti od post-transkripcione obrade genskog transkripta (Xystrakis i sar., 2004). Timociti, kao

i T-limfociti koji su tek napustili timus ispoljavaju CD90 molekul na svojoj površini i za razliku od ostalih naivnih T-ćelija, ne ekspimiraju tešku izoformu CD45R (Hosseinzadeh i Goldschneider, 1993). Ovakav fenotip, novoformirani T-limfociti zadržavaju približno nedelju dana nakon izlaska iz timusa, i nakon toga snižavaju ekspresiju CD90 molekula, a povećavaju ekspresiju teške izoforme CD45R molekula (Hosseinzadeh i Goldschneider, 1993).

Tokom ontogeneze, kod glodara, broj T-limfocita u perifernoj krvi i sekundarnim limfoidnim organima raste, prevashodno kao posledica izlaska novoformiranih T-limfocita iz timusa (Goldrath i Bevan, 1999, Freitas i Rocha, 2000). Nakon dostizanja adultne veličine, veličina populacije T-limfocita se održava tokom čitavog života (Tough i Sprent, 1994).

#### ***1.4. Diferencijacija/sazrevanje T-ćelija i hormoni jajnika***

Ranije se verovalo da timus funkcioniše izolovano od signala koji potiču iz drugih regulatornih sistema i da u regulaciji timusne funkcije učestvuju isključivo faktori poreklom iz samog timusa i imunskog sistema. Međutim, poslednjih decenija je sve više eksperimentalnih i kliničkih podataka koji ukazuju na to da na proces diferencijacije/sazrevanja T-limfocita u timusu utiče čitav niz faktora (neurotransmiteri, neuropeptidi i hormoni) poreklom iz nervnog i endokrinog sistema (Savino i Dardenne, 2000). Zahvaljujući prisustvu receptora za ove molekule na ćelijama timusa oni modulišu proces diferencijacije/sazrevanja timocita delujući direktno na timocite ili indirektno, delujući na ćelije timusne strome, pre svega TEC, modulišući njihove interakcije sa timocitima i/ili sekreciju solubilnih molekula (citokina, hemokina i faktora rasta) neophodnih za odvijanje timopoeze (Dardenne i Savino, 1994; Savino i Dardenne, 2000; Savino i sar., 2002). Među ovim faktorima, poseban značaj u regulaciji timusne funkcije pridaje se polnim hormonima. Istraživanjima prikazanim u ovoj disertaciji ispitan je uticaj hormona jajnika, pa će naredni deo teksta biti usmeren na prikaz aktuelnih saznanja o njihovom delovanju na timus.

#### ***1.4.1. Ekspresija receptora za estrogen u timusu***

Tradicionalno se smatra da se većina bioloških efekata estrogena ostvaruje njihovim vezivanjem za intracelularne estrogenske receptore (ER), ER $\alpha$  i ER $\beta$ , koji pripadaju superfamiliji jedarnih, ligand-zavisnih transkripcionih faktora (Ellmann i sar., 2009). Ovi receptori utiču na transkripciju pojedinih gena tako što, nakon vezivanja liganda, formiraju homo ili heterodimere, migriraju u jedro i vezuju se za specifične sekvence u promotorskom regionu tih gena (engl. estrogen response elements, ERE) (Ellmann i sar., 2009). Međutim, pokazano je da proces aktivacije ili represije transkripcije gena zavisi i od proteina koji učestvuju u stabilizaciji receptorskog kompleksa i/ili regrutovanju enzima neophodnih za modifikaciju hromatina, koji se nazivaju koaktivatori i korepresori (Ellmann i sar., 2009). Takođe, pokazano je da estradiol može dovesti i do brzih negenomskih promena u ćelijama delujući posredstvom klasičnih steroidnih receptora smeštenih u plazma membrani ili posredstvom proteinskog membranskog receptora GPR30 (Manavathi i Kumar, 2006, Heldring i sar., 2007). Tako vezivanje estrogena za ER, u različitim ćelijama može za posledicu imati aktivaciju različitih gena i/ili signalnih puteva u zavisnosti od prirode i koncentracije liganda, nivoa ekspresije pojedinih subtipova ER, kao i prisustva pojedinih koaktivatora i korepresora (Frasor i sar., 2003a, McDonnell, 2004).

Prisustvo klasičnih intracelularnih ER pokazano je u timocitima miša (Tornwall i sar., 1999, Wang i sar., 2008), pacova (Mor i sar., 2001; Radojević i sar., 2011), i čoveka (Nancy i Berrih-Aknin, 2005). Pored toga, na timocitima miša pokazano je i prisustvo membranskog receptora za estrogene GPR30 (Wang i sar., 2008).

Pored timocita, prisustvo klasičnih intracelularnih ER pokazano je i u ćelijama timusne strome, koje uglavnom odgovaraju TEC, lociranim u nivou KMZ i u subkapsularnom odeljku timusa (Savino i sar., 1988, Seiki i sar., 1988, Kawashima i sar., 1991).

#### ***1.4.2. Ekspresija receptora za progesteron u timusu***

Većina bioloških efekata progesterona ostvaruje se vezivanjem za klasične intracelularne receptore za progesteron (PR), koji nastaju kao posledica alternativne

obrade jedinstvenog genskog transkripta za PR, kao dve izoforme, PRA i PRB (Kastner i sar., 1990). Nakon vezivanja za progesteron ovi receptori formiraju dimere, migriraju u jedro i vezuju se za odgovarajuća mesta u promotorskom regionu gena (Kastner i sar., 1990).

Pored toga, pokazano je da progesteron svoje delovanje može ostvariti vezivanjem za jedan od tri tipa membranskih receptora za progesteron (mPR) (Dosiou i sar., 2008). Vezivanjem za mPR ostvaruju se brzi, negenomski efekti progesterona (Schmidt i sar., 2000).

U zavisnosti od nivoa ekspresije pojedinih subtipova PR, vezivanje za progesteron može za posledicu imati aktivaciju različitih gena/signalnih puteva ili njihovu inhibiciju. Takođe je važno istaći da u regulaciji ekspresije PR učestvuju, kako sam progesteron, tako i estrogen (Kato i sar., 1978; Uotinen i sar., 1999).

Primenom klasičnih biohemijskih ispitivanja vezivanja hormona obeleženih radioaktivnim izotopima, dokazano je prisustvo vezujućih mesta za progesteron u timocitima pacova (Fujii-Hanamoto i sar., 1985).

Pored timocita, receptori za progesteron detektovani su i u ćelijama strome timusa pacova, miša i čoveka (Fujii-Hanamoto, 1990). Takođe, na membrani TEC pokazano je i prisustvo mPR (Head i sar., 1999).

#### ***1.4.3. Uticaj hormona jajnika na diferencijaciju/sazrevanje timocita***

Najraniji podaci o delovanju hormona gonada na timus potiču još iz 19. veka (Calzolari, 1898). Ova ispitivanja ukazala su na stimulatorni uticaj uklanjanja gonada na masu timusa (Calzolari, 1898).

Nakon toga, čitav niz istraživanja *in vivo* kao i *in vitro* (Fitzpatrick i Greenstein, 1987; Phuc i sar., 1981a, 1981b; Screpanti i sar., 1991; Sakabe i sar., 1999; Yao i Hou, 2004; Li i McMurray, 2006; Zoller i sar., 2007), nesumljivo je pokazao da hormoni jajnika, utiču na celularnost i strukturu timusa, kao i na njegovu funkciju. Pokazano da davanje visokih koncentracija estrogena, kod eksperimentalnih životinja oba pola dovodi do atrofije timusa, koja se manifestuje smanjenjem ukupnog broja timocita i promenama u strukturnoj organizaciji organa (Fitzpatrick i Greenstein, 1987; Screpanti i sar., 1989 ; Leposavić i sar., 2001; Yao i Hou, 2004). Veliki broj *in vivo* i *in vitro*



studija je pokazao da estrogeni dovode do smanjenja broja timocita, delujući na njihovo preživljavanje (Mor i sar., 2001; Hoffman-Goetz i sar., 2001; Okasha i sar., 2001; Yao i Hou, 2004; Wang i sar., 2008). Pored toga, pokazano je da estrogen inhibitorno deluje na proliferaciju timocita, što se ogleda u smanjenom preuzimanju radioaktivnog timidina (engl. [3H] thymidine), smanjenju mitotskog indeksa i zastupljenost limfoblasta u timocitnim suspenzijama fetusa zamorca nakon tretmana estradiolom (Gulino i sar., 1985). Ovi nalazi su dalje podržani studijom kojom je pokazano da tretman estradiolom dovodi do gubitka progenitorskih ćelija kostne srži sa visokim proliferativnim i T-linijskim potencijalom, kao i intratimusnih progenitora (Zoller i Kersh, 2006). Konačno, pokazano je da u timusu životinja tretiranih estradiolom dolazi do povećanja zastupljenosti najzrelijih ćelija, CD4+CD8- fenotipa (Screpanti i sar., 1991; Brunelli i sar., 1992; Kovacs i Olsen, 1998; Leposavić i sar., 2001), što jasno ukazuje da ovaj hormon ne utiče samo na celularnost organa, već i na proces diferencijacije/sazrevanja T-ćelija.

Pored direktnog delovanja na timocite, eksperimentima *in vitro* pokazano je da estrogen inhibitorno deluje na proliferaciju IT-45R1 ćelijske linije TEC pacova (Sakabe i sar., 1994). Imajući u vidu da ove ćelije imaju značajnu ulogu u diferencijaciji/sazrevanju T-ćelija (Boyd i sar., 1993), može se pretpostaviti da svoj uticaj na proces timopoeze estrogeni ostvaruju i posredno, delujući na TEC. U prilog ovoj pretpostavci idu podaci koji pokazuju da estrogen utiče i na sposobnost TEC da sekretuju citokine značajne za proces diferencijacije/sazrevanja timocita. Naime, eksperimentima *in vivo* pokazano je da estrogen ispoljava supresivno delovanje na ekspresiju gena za IL-7 u timusu (Ryan i sar., 2005). Smatra se da je ovaj citokin kritičan za odvijanje najranijih stadijuma diferencijacije/sazrevanja timocita kod miša, budući da njegov deficit dovodi do smanjenja ukupnog broja timocita usled zastoja u diferencijaciji/sazrevanju timocita na DN2 stadijumu (Peschon i sar., 1994; von Freeden-Jeffrey i sar., 1995). Pored toga, pokazano je da estrogeni deluju inhibitorno na ekspresiju gena za IL-6 (Galien i Garcia, 1997; Selvaraj i sar., 2005). Ovaj citokin značajan je za proliferaciju TEC, regulaciju ekspresije gena za čitav niz citokina u timusu, kao i za proliferaciju timocita (Wolf i Cohen, 1992). Imajući u vidu podatke koji ukazuju na to da tretman ovim citokinom, kod miša dovodi do promena mase i strukture timusa, nalik na promene koje se dešavaju tokom procesa starenja (Sempowski

i sar., 2000), sa jedne strane, kao i činjenicu da tokom starenja dolazi do povećanja koncentracije ovog citokina u timusu miša i čoveka (Semprowski i sar., 2002), sa druge strane, pretpostavlja se da IL-6 ispoljava bifazno delovanje na timus, delujući stimulatorno u niskim koncentracijama, a inhibitorno u visokim (Tseng i sar., 2010). Konačno, pokazano je da davanje estradiola dovodi do promena u lučenju timusnih hormona (Sakabe i sar., 1999), značajnih za preživljavanje i proliferaciju, kako timocita, tako i samih TEC (Wolf i Cohen, 1992).

Za razliku od estradiola, pokazano je da samo veoma visoka koncentracija progesterona dovodi do atrofije timusa (Kuhl i sar., 1983). Kasnijom studijom je pokazano da davanje progesterona kod miša, nema značajnih efekta na zastupljenost timocitnih subpopulacija (Rijhsinghani i sar., 1996). Pored toga, eksperimentima *in vitro* pokazano je da progesteron ima bifazno delovanje na proliferaciju ćelija IT-45R1 linije pacova, delujući stimulatorno u niskim koncentracijama, dok u koncentraciji koja je veća od one koja obezbeđuje maksimalno povećanje broja ćelija pokazuje dozno-zavisno inhibitorno delovanje (Sakabe i sar., 1994). Takođe, pokazano je da u kulturi TEC pacova, visoke koncentracije progesterona, menjaju sekreciju timusnih hormona (Head i sar., 1999).

Treba napomenuti da pored steroidnih i nesteroidni hormoni jajnika, kao što su aktivin i inhibin, delujući timocite i ćelije strome timusa na receptor specifičan način (Rosendahl i sar., 2003; Licona i sar., 2006), mogu uticati na proces diferencijacije/sazrevanja timocita. Tako je *in vitro* studijama pokazano da aktivin deluje supresivno, dok inhibin ima suprotan, stimulišući, efekat na proliferaciju timocita (Hedger i sar., 1989, 2000). Novijom studijom pokazano je da, kod miša, aktivin i inhibin stimulatorno deluju na rane stadijume diferencijacije/sazrevanja timocita, a da na kasnijim stadijumima deluju stimulišući diferencijaciju/sazrevanje timocita ka ćelijama CD4-CD8<sup>+</sup> fenotipa (Licona-Lemon i sar., 2009). Pored toga, ispitivanja u fetalnoj organ kulturi timusa, poreklom iz miševa sa deficitom gena za inhibin  $\alpha$  (engl. inhibin  $\alpha$  knock-out mice, inhibin  $\alpha^{-/-}$ ), pokazano je da deficit inhibina ima za posledicu zastoj na najranijim stadijumima diferencijacije/sazrevanja timocita i posledično smanjenje celularnosti organa (Lincona-Lemon i sar., 2009).

### ***1.5. Interakcija hormona jajnika i kateholamina u regulaciji diferencijacije/sazrevanja timocita***

Brojni nalazi govore u prilog tezi da se delovanje gonadnih hormona na ciljne ćelije, pored direktnog delovanja, može odvijati i promenom raspoloživosti drugih bioloških aktivnih supstanci, prevashodno kateholamina (Da Silva, 1999). Shodno tome, može se pretpostaviti da hormoni jajnika mogu da utiču i na timus, ne samo direktno, delovanjem na limfoidne i nelimfoidne ćelije strome timusa, već i indirektno, modulacijom delovanja kateholamina u timusu.

U prilog prethodne pretpostavke govore podaci da hormoni jajnika utiču na koncentraciju noradrenalina (Kendall i sar, 1994; Clarke i Kendall, 1994; Pilipović i sar., 2008) u timusu, delujući na sadržaj ovog neurotransmitera u nervnim vlaknima, koja su glavni izvor kateholamina u timusu (Kendall i sar, 1994; Clarke i Kendall, 1994). Pokazano je da hormoni jajnika utiču na gustinu timocita i/ili nelimfoidnih ćelija koje sintetišu kateholamine u timusu i na sadržaj ovog hormona u njima (Pilipović i sar., 2008). Pored toga, pokazano je da ekspresija  $\beta$ - adrenergičkih receptora (AR) u timusu ženki pacova varira u zavisnosti od faze estrusnog ciklusa, i pozitivno korelira sa nivoom estrogena (Marchetti i sar., 1990; 1994).

Sa druge strane, pokazano je da hronični tretman antagonistom  $\beta$ - AR dovodi do promene ekspresije antigena diferencijacije/sazrevanja timocita kao i proliferacije i apoptoze ovih ćelija, kako kod miša (Madden i Felten, 2001), tako i kod pacova (Rauški i sar., 2003; Leposavić i sar., 2006; 2007; Pešić i sar., 2007).

Na osnovu svega navedenog, može se pretpostaviti da steroidni hormoni jajnika na proces diferencijacije/sazrevanja timocita utiču, ne samo direktno, već i indirektno, menjajući delovanje kateholamina.

### ***1.6. Timusne promene tokom ontogeneze***

Tokom ontogeneze timus pokazuje brojne strukturne i funkcijske promene. Kod glodara, masa i celularnost timusa progresivno se uvećavaju od rođenja da bi dostigli maksimum u periodu sticanja polne zrelosti (kod pacova oko 40. postnatalnog dana),

nakon čega se progresivno smanjuju (Pearse, 2006). Dinamika promene mase i celularnosti varira između vrsta i sojeva (Pearse, 2006), ali kod svih sisara, tokom postnatalnog života dolazi do involucije timusa, koja podrazumeva, promene strukturne organizacije organa, progresivno smanjenje broja timocita, kao i smanjenu sposobnost stvaranja novih T-ćelija (Metcalf i sar., 1967, George i Ritter, 1996; Douek i sar., 1998; Globerson i Efros, 2000; Romanyukha i Yashin, 2003). Promene u funkciji timusa dovode do smanjenog izlaska novoformiranih T-limfocita i povezuju se sa brojnim promenama u T-ćelijskom odeljku imunskog sistema.

Generalno, promene u strukturnoj organizaciji timusa podrazumevaju sužavanje korteksa, gubitak jasne granice između korteksa i medule, kao i pojava oblasti bez TEC (Pearse, 2006). Tokom involucije timusa, dolazi do disproporcionalnog gubitka TEC u odnosu na ostale nelimfoidne ćelije strome timusa (Bertho i sar., 1997), kao i do promena u zastupljenosti pojedinih populacija TEC (Ortman i sar., 2002; Gray i sar., 2006). Pored promena u zastupljenosti TEC, tokom procesa involucije timusa dolazi i do promena u njihovoj funkciji. Ove promene se ogledaju u promeni sinteze i sekrecije solubilnih faktora neophodnih za preživljavanje i diferencijaciju/sazrevanje timocita. Tako je pokazano da se u timusu miša nivo IL-7 smanjuje tokom involucije organa (Andrew i Aspinall, 2002; Ortman i sar., 2002), dok nivoi inhibitorynog faktora leukemije (engl. leukemia inhibitory factor, LIF), onkostatina (engl. oncostatin M, OSM) i SCF rastu (Sempowski i sar., 2000).

Paralelno sa promenama u timusnoj stromi, dolazi i do promena u procesu diferencijacije/sazrevanja T-ćelija, što ima za posledicu smanjeno stvaranje i izlazak T-limfocita na periferiju (Berzins i sar., 1998; Douek i sar., 1998; Globerson i Efros, 2000; Romanyukha i Yashin, 2003; Shanker, 2004; Taub i Longo, 2005).

Pokazano je da broj limfoidnih prekursora koji naseljavaju timus, kao i ranih intratimusnih progenitora, dramatično opada sa početkom involucije timusa (Zediak i sar., 2007). Ove promene delom su posledica intrinzičnih promena u samim hematopoetskim ćelijama kostne srži (Zediak i sar., 2007), ali verovatno, delom i posledica promena koje se dešavaju u stromalnim ćelijama kostne srži, budući da ove ćelije obezbeđuju signale neophodne za preživljavanje, proliferaciju i mobilizaciju limfoidnih prekursora.

Pored toga, involuciju timusa karakteriše i niz promena, kako u ranim TCR nezavisnim fazama timopoeze (Thoman, 1995), tako i na TCR zavisnim stadijumima diferencijacije/sazrevanja timocita (Lau i Spain, 2000). Pokazano je da, sa starenjem, dolazi do otežanog prelaska timocita iz DN1 u DN2 stadijum diferencijacije (Aspinall i Andrew, 2001), kao i do promena u procesu rearanžmana gena za TCR i posledično smanjenja broja ćelija koje „prolaze“  $\beta$ -selekciju (Aspinall, 1997; Lacorazza i sar., 1999). Kao posledica promena tokom procesa involucije timusa, u timusu miša (Thoman, 1995) i pacova (Capri i sar., 2000) dolazi do povećanja procenta najnezrelijih CD4-CD8-DN ćelija i smanjenja procenta CD4+CD8+DP ćelija. Pored toga, pokazano je i da sa involucijom timusa dolazi do povećanog ulaska zrelih T-limfocita sa periferije u timus (Hirokawa i sar., 1989; Agus i sar., 1991), što najverovatnije potencira uticaj zrelih CD4+ T-ćelija na diferencijaciju timocita (Mehr i sar., 1996; 1997). Naime, smatra se da ove ćelije mehanizmom negativne povratne sprege dovode do usporenog prelaska iz DN u DP stadijum diferencijacije, dok mehanizmom pozitivne povratne sprege ubrzavaju diferencijaciju DP ćelija ka ćelijama CD4+CD8- fenotipa (Mehr i sar., 1996; 1997).

Još uvek se vodi polemika oko toga, da li tokom procesa involucije timusa intrinzične promene ćelija timusne strome, pre svega TEC (Aspinall i Andrew, 2001; Aw i sar., 2008), indukuju promene u timopoezi ili intrinzične promene u samim limfoidnim progenitorima (Min i sar., 2004), dovode do promena u diferencijaciji/sazrevanju timocita. Međutim, imajući u vidu međusobnu komunikaciju timocita i timusnih epitelnih ćelija, smatra se da, bez obzira na inicijalni razlog nastanka, promene na nivou jedne komponente, dovode do promena druge komponente, odnosno do pokretanja spirale međusobno uslovljenih događaja koja dovodi do, za involuciju timusa, karakterističnih promena strukture i funkcije organa (Min i sar., 2005).

Pored toga, smatra se da delovanje različitih ekstrinzičkih faktora, kakvi su hormoni, peptidi ili neurotransmiteri, poreklom iz nervnog i endokrinog sistema, delovanjem bilo na limfoidnu bilo na nelimfoidnu komponentu timusa može uticati na inicijaciju i/ili progresiju involucije timusa. Veliki broj istraživanja u proteklom decenijama bio je fokusiran na ulogu medijatora poreklom iz nervnog i endokrinog sistema, na strukturu i funkciju timusa. U literaturi postoje podaci koji ukazuju da bi

promene u koncentraciji melatonina, oslobađajućeg hormona za gonadotropine (engl. gonadotropin-releasing hormone, GnRH), hormona rasta, tireotropnog hormona, kortikosteroida i polnih hormona mogle da utiču na involuciju timusa, koja kod glodara počinje u pubertetu (Grossman, 1985; Aspinall i Andrew, 2001; Mocchegiani i sar., 2006; Lynch i sar., 2009).

Važno je naglasiti i da je, uprkos brojnim podacima koji ukazuju na to da, tokom postnatalnog života timus involuira i da ovaj proces, kod čoveka započinje rano tokom ontogeneze, pokazano da timus, produkuje nove T-ćelije veoma dugo nakon ispoljavanja prvih znakova involucije (Douek i sar., 1998). Ovaj nalaz otvorio je prostor za razmišljanje o eksperimentalnim postupcima kojima bi se moglo uticati na povećanje timusne funkcije. Čitav niz istraživanja tokom protekle decenije pokazuje da se kod eksperimentalnih životinja tretmanom različitim citokinima: IL-7 (Andrew i Aspinall, 2001), Fl3t hemokinom (Fms-like tyrosine kinase 3, Flt3), KGF i hormonima (hormon rasta, insulinu sličan hormon rasta, grelin), mogu ublažiti promene timusa tokom starenja i u različitoj meri povećati-povratiti efikasnost timusne funkcije (Lynch i sar., 2009). Imajući u vidu ovakvu plastičnost timusa, jasno da je otkrivanje uzročnika ili faktora koji doprinose involuciji timusa važno, ne samo sa aspekta razumevanja promena koje se dešavaju u T-ćelijskom odeljku tokom starenja, već i za razvoj strategija koje bi omogućile održavanje i povećanje timusne funkcije. Ovo je od naročitog značaja ako se ima u vidu da je povećanje efikasnosti timopoeze kritično u stanjima imunodeficijencija nastalih kao posledica patoloških procesa, infekcije, kao što je HIV (engl. Human immunodeficiency virus, HIV) ili usled delovanja različitih egzogenih faktora, kao što su radioterapija i hemoterapija (Lynch i sar., 2009).

### ***1.7. Involucija timusa i polni hormoni***

Brojni nalazi upućuju na to da hormoni hipotalamo-hipofizo-gonadne (H-H-G) osovine (GnRH, gonadotropini i polni steroidi) imaju značajnu ulogu u razvoju i funkciji timusa. Naime, pokazano je da postoji međuzavisnost u razvoju H-H-G i timo-limfatične osovine (Pierpaoli i Besedovsky, 1975; Morale i sar., 1991; Besedovsky i Del Ray, 1996). Perinatalni period, tokom koga se odvijaju promene značajne za programiranje neuroendokrinih funkcija mozga (Jost, 1969), takođe je značajan i za

programiranje reproduktivnih i imunskih funkcija (Gorski, 1971; Arai i sar., 1986; Morale i sar., 1991). Hirurško uklanjanje timusa prvog dana nakon rođenja ima za posledicu promene u lučenju gonadotropina (Ruitenberga i Berkvens, 1977) i poremećaj u razvoju reproduktivnih organa ženki miševa i pacova (Besedovsky i Sorkin, 1974; Pierpaoli i Besedovsky, 1975). Takođe, pokazano je da miševi tzv. „nude“ fenotipa (životinje sa hipoplazijom timusa usled nedostatka gena za FoxN1 transkripcioni faktor), odlikuje nizak fertilitet usled smanjenog nivoa gonadotropina u serumu, što se može sprečiti transplantacijom timusa ovim životinjama prvog postnatalnog dana (Linten-Moore i Pantelouris, 1976).

Ispitivanja na miševima kojima je uklonjen gen za različite subtipove ER (engl. „knock-out“) su pokazala da je prisustvo ER subtipa  $\alpha$  neophodno za normalan ontogenetski razvoj timusa, kako kod ženki, tako i kod mužjaka (Staples i sar., 1999; Yellayi i sar., 2000). Sa porastom koncentracije hormona jajnika u pubertetu započinje involucija timusa (Schuurs i Verheul, 1990). Ispitivanja na „knock-out“ životinjama, pokazala su da je za ovaj proces, pored ER subtipa  $\alpha$ , neophodno i prisustvo intracelularnog ER subtipa  $\beta$  i membranskog GPR30 receptora (Bodey i sar., 1997; Staples i sar., 1999; Yellayi i sar., 2000; Erlandsson i sar., 2001; Wang i sar., 2008). Na osnovu ovih podataka, može se zaključiti da hormoni jajnika podstiču razvoj timusa u ranom životnom dobu dok u pubertetu, sa porastom koncentracije ovih hormona, dolazi do promene u njihovom delovanju tako da se oni smatraju, makar delimično, odgovornim za involuciju timusa (Grossman, 1985; Bodey i sar., 1997).

Pored toga, studijama u kliničkim i eksperimentalnim uslovima ustanovljeno je postojanje seksualnog dimorfizma u brojnim aspektima funkcije imunskog sistema. U poređenju sa mužjacima, ženke pacova i miševa imaju viši nivo imunoglobulina u serumu, intenzivniji i dugotrajniji imunski odgovor kao i kraće vreme odbacivanja alografta (Dorner, 1980; Grossman, 1985; Kovacs i Olsen, 1998). Ženke takođe imaju viši odnos zastupljenosti T i B ćelija u slezini i izraženu dominaciju CD4<sup>+</sup> limfocita na periferiji (Grossman, 1985; Kovacs i Olsen, 1998; Shames, 2002). Budući da su T-limfociti ključni za adaptivni imunski odgovor, smatra se da veliki broj ovih razlika, nastaje kao posledica razlika u obrascu diferencijacije/sazrevanja T-limfocita u timusu (Ansar Ahmed i sar., 1985; Kovacs i Olsen, 1998).

Na moguću ulogu hormona jajnika u involuciji timusa ukazuje čitav niz eksperimentalnih podataka. Pokazano je da tokom trudnoće, u uslovima povećanog nivoa hormona jajnika u cirkulaciji, dolazi do prolazne involucije timusa (Phuc i sar., 1981a, Phuc i sar., 1981b, Clarke i Kendall, 1994, Rijhsinghani i sar., 1996, Kendall i Clarke, 2000). Osim toga, nađeno je da davanje estrogena u visokoj dozi dovodi do involucije timusa slične onoj koja se dešava tokom fiziološkog starenja (Kuhl i sar., 1983, Luster i sar., 1984, Ansar Ahmed i sar., 1985, Windmill i sar., 1993, Oner i Ozan, 2002, Yellayi i sar., 2002.). Konačno, hirurško ili hemijsko uklanjanje ovarijuma pre puberteta ili u ranom adultnom uzrastu dovodi do hipertrofije timusa (Utsuyama i Hirokawa, 1989, Blacker i sar., 1991, Windmill i sar., 1993, Lepasavić i sar., 1996, Pejčić-Karapetrović i sar., 2001; Lepasavić i sar., 2005a). Takođe je pokazano da je za potpuno ispoljavanje involutivnog efekta estrogena na timus neophodno prisustvo progesterona (Tibbetts i sar., 1999).

Međutim, novijim ispitivanjima dovedena je u pitanje uloga polnih hormona u involuciji timusa (Min i sar., 2006). Naime, Min i njegovi saradnici (2006) su pokazali da su posledice uklanjanja jajnika kod 4 nedelje starih miševa C57BL/6J (B6), soja, na ukupan broj timocita prolazne, tako da 20 nedelja nakon uklanjanja jajnika nema razlike u ukupnom broju timocita između kontrolnih i ovarijektomisanih životinja. Na osnovu ovih nalaza, Min i njegovi saradnici dovode u pitanje ulogu hormona jajnika u involuciji timusa.

Nekoliko objašnjenja može se pružiti za prethodne nalaze. Prvo, može se pretpostaviti da porast koncentracije hormona jajnika u pubertetu dovodi do započinjanja, ili što je verovatnije, doprinosi započinjanju involucije timusa, a da intrinzični defekti progenitorskih ćelija i/ili ćelija timusne strome, kasnije omogućavaju održavanje/napredovanje involucije timusa nezavisno od prisustva hormona jajnika. Drugo, ograničeno trajanje efekata uklanjanja jajnika na timus može se objasniti kompenzatornom produkcijom polnih hormona, konkretno, produkcijom estrogena od strane ćelija nadbubrežne žlezde ili masnog tkiva. U prilog ove pretpostavke idu nalazi da se u serumu miševa kojima su uklonjeni jajnici dugo održava visok nivo estrogena (Hince i sar., 2008). Konačno, može se pretpostaviti da porast koncentracije polnih hormona u pubertetu dovodi do promena u drugim regulatornim sistemima, koji svojim delovanjem održavaju involuciju timusa. Jedan od kandidata za takvo delovanje polnih



hormona su kateholamini, budući da je pokazano da sa starenjem koncentracija noradrenalina u timusu (Bellinger i sar., 1988, Madden i sar., 1997, Cavallotti i sar., 1999, Leposavić i sar., 2010), kao i gustina noradrenergičkih nervnih vlakana rastu (Madden i sar., 1997, Cavallotti i sar., 1999, Leposavić i sar., 2010).

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da, uprkos brojnim istraživanjima u proteklim decenijama, uloga hormona jajnika u procesu involucije timusa, do kraja nije rasvetljena. Ostaje otvoreno pitanje da li inicijacija involucije timusa samo koincidira sa porastom koncentracije hormona jajnika u periodu puberteta ili između ova dva događaja postoji uzročno-posledična veza. Pored toga, za razliku od mužjaka miševa i pacova, kod kojih je uklanjanjem hormona gonada, u uzrastu kada je došlo do makroskopski potpune involucije organa, pokazana potpuna reverzija involutivnih promena (Greenstein i sar., 1986; Sutherland i sar., 2005), što ukazuje na to da su hormoni gonada kod mužjaka neophodni za održavanje i napredovanje involucije timusa, nema sličnih podataka kada su u pitanju ženke ovih životinja. Prema tome, bilo bi od naročitog značaja odgovoriti na pitanje da li su hormoni jajnika značajni samo za započinjanje i/ili za održavanje involucije timusa.

## **2. CILJEVI**

Imajući u vidu sve što je prethodno navedeno mogu se postaviti makar dva pitanja, pa su shodno tome i formulisana dva cilja ove doktorske disertacije :

- Prvi, da se odgovori na pitanje da li je promenama u ontogenetskom razvoju H-H-G osovine i odlaganjem hormonskih promena karakterističnih za pubertet moguće odložiti i početak involucije timusa i, posledično smanjenje efikasnosti timopoeze.
- Drugi, da li je u uzrastu, kada su involutivne promene timusa jasno izražene, promenom hormonskog „miljea“ koji oblikuju hormoni jajnika, moguće učiniti reverziju involutivnih promena ili te promene usporiti/zaustaviti.

Da bi se odgovorilo na prvo pitanje, ženke pacova su podvrgnute jednokratnom davanju testosterona u kritičnom periodu (kasni prenatalni period i prvih 10 dana postnatalno). Ovaj tretman (neonatalna androgenizacija), remeti normalan ontogenetski razvoj H-H-G osovine, odlaže pubertet i dovodi do defeminizacije/maskulinizacije brojnih seksualno dimorfnih moždanih struktura, uključujući i one koje kontrolišu reproduktivnu funkciju. Ove promene kod odraslih životinja uslovljavaju razvoj hiperestrogenemije sa smanjenom osetljivošću ćelija ciljnih tkiva na delovanje estrogena, hiperandrogenemije i hipoprogesteronemije (Barraclough, 1961; Gorski, 1971; Arai i sar., 1986; Morale i sar., 1991; Bukovsky i sar., 2000; 2002).

Da bi se odgovorilo na drugo pitanje izvršeno je hirurško uklanjanje jajnika ženkama pacova koje, za razliku od ženki miša, zadržavaju visok nivo estrogena u serumu do u duboku starost (Maffucci i Gore, 2006), u uzrastu od 10 meseci, kada su već uznapredovale involutivne promene u građi i funkciji timusa (Perišić i sar., 2010).

Kod neonatalno androgenizovanih ženki u uzrastu od 3 meseca i kod ovarijektomisanih životinja u uzrastu od 11 meseci analizirana je:

- masa timusa i ukupan broj timocita, njihova apoptoza i proliferacija, kao i ekspresija antigena diferencijacije T-ćelija, uključujući i one koji su specifični za Treg i NKT ćelije;
- zastupljenost svežih timusnih emigranata, CD4+ i CD8+ T-limfocita, kao i subpopulacija regulatornih ćelija (Treg i NKT ćelija) u perifernoj krvi i slezini.

Konačno, da bi se upotpunila slika kompleksne uloge hormona jajnika u involuciji timusa, u timusima neonatalno androgenizovanih ženki i ovarijsktomisanih životinja analizirana je :

- zastupljenost TEC, kao najznačajnije komponente timusne mikrosredine;
- ekspresija gena za citokine (IL-6 i IL-7), koji imaju važnu ulogu u regulaciji diferencijacije/sazrevanja timocita, ali i u involuciji timusa;
- zastupljenost noradrenergičkih nervnih vlakana i timusnih ćelija koje sintetišu kateholamine, kao potencijalnih ciljnih struktura delovanja hormona jajnika u timusu, sadržaj noradrenalina u njima i ispoljavanje  $\alpha$ - i  $\beta$ -AR na timocitima.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Eksperimentalne životinje**

U eksperimentalnom radu su korišćene ženke pacova AO (engl. Agouti Oxford, AO) srodničkog (engl. inbred) soja, odgajane u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu. Životinje su gajene pod standardnim laboratorijskim uslovima: konstantnom temperaturom ( $21 \pm 2$  °C), relativnom vlažnošću vazduha (50%- 60%) i režimom 12h svetlo-12h mrak i slobodnim pristupom hrani i vodi (*ad libitum*). Po tri životinje smeštane su u providne pleksiglas kaveze dimenzija 25cm×41cm×15cm sa sterilnom piljevinom.

##### **3.1.1. Eksperimentalne grupe**

Studija je obuhvatila dve grupe eksperimenata. U prvoj grupi eksperimenata, po rođenju ženke pacova nasumično su deljene na tri grupe: kontrolne (intaktne) životinje, životinje koje su podvrgnute jednokratnom davanju testosteron enantata drugog postnatalnog dana-neonatalno androgenizovane životinje (NA) i životinje koje su podvrgnute jednokratnom davanju maslinovog ulja-uljem tretirane (UT) životinje. U drugoj grupi eksperimenata 10 meseci stare ženke pacova nasumično su deljene na tri grupe: kontrolne (intaktne) životinje, životinje kojima je izvršeno hirurško uklanjanje jajnika-ovarijektomisane (OVX) i „lažno“ (engl. sham) ovarijektomisane (Sham-OVX) životinje.

Uticaj promene gonadnog hormonskog miljea na timus ispitivan je analizom: 1) mase timusa i broja timocita; 2) fenotipskih karakteristika timocita kao i njihove apoptoze i proliferacije; 3) relativne zastupljenosti TEC, kao najznačajnije komponente mikrosredine timusa i ekspresije gena za citokine (IL-6 i IL-7) u tkivu timusa; 4) fenotipskih karakteristika T-limfocita periferne krvi i slezine, 5) koncentracije kateholamina, simpatičke inervacije timusa, gustine ekspresije ćelija koje sintetišu kateholamine u timusu, kao i ekspresije AR.

Studija je obuhvatila dve serije eksperimenata. Timusi, slezine i periferna krv životinja iz prve serije eksperimenata korišćeni su za imunocitohemijska bojenja i imunofenotipsku analizu metodom protočne-citofluorimetrije (engl. flow cytometry analysis, FCA), a timusi životinja iz druge serije eksperimenata korišćeni su za histofluorescentno bojenje, merenje koncentracije kateholamina i nivoa iRNK za IL-6 i IL-7 u tkivu.

Pored opisanih eksperimentalnih grupa, za analizu mase timusa i broja timocita kod 11 meseci starih životinja, pored OVX i kontrolnih (intaktne i Sham-OVX) 11 meseci starih životinja, korišćene su i intaktne ženke pacova uzrasta 10 meseci.

### ***3.1.2. Dozvola Etičkog komiteta***

Za izradu ove doktorske disertacije 3. februara 2010. godine dobijena je dozvola Etičkog komiteta Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi eksperimenti su izvedeni u skladu sa propisima Etičkog komiteta i principima Komisije Evropske zajednice važećim od 24. novembra 1986. godine (86/609/EEC) i dopunjenim 22. septembra 2010. godine (2010/63/EU).

## ***3.2. Eksperimentalni protokol***

### ***3.2.1. Neonatalna androgenizacija***

Dan rođenja životinje je označen kao „nulti“ dan. Drugog postnatalnog dana ženke pacova su androgenizovane subkutanom ubrizgavanjem testosteron enantata (Galenika AD, Zemun) u dozi od 1000 µg u 50 µl sterilnog prečišćenog maslinovog ulja. Preliminarnim eksperimentima pokazano je da ova doza testosteron enantata odlaže ulazak u pubertet što je u saglasnosti i sa podacima drugih autora (Suzuki i sar., 1998; Watanobe i Habu, 2003). Kontrolne životinje su tretirane istom količinom sterilnog prečišćenog maslinovog ulja.

Nastupanje puberteta kod pacova označava period tokom koga se, između ostalog,

odvija vaginalno otvaranje i započinje prvi estrusni ciklus (Azooz i sar., 2001). Estrusni ciklus kod pacova traje 4-5 dana i obuhvata četiri faze: proestrus, estrus, diestrus-1 (metaestrus) i diestrus-2 (Barraclough, 1972). Svaka od ovih faza ima svoje karakteristike koje se mogu pratiti kroz citološku analizu vaginalnog brisa. Uspešnost tretmana je ispitivana praćenjem početka vaginalnog otvaranja i pregledom vaginalnih briseva. Vaginalno otvaranje je kod kontrolnih i UT ženki zabeleženo između 33. i 35. postnatalnog dana. Kod ženki tretiranih testosteron enantatom vaginalno otvaranje nije zapaženo do 90. dana starosti, što sugerise odloženo seksualno sazrevanje.

Vaginalni brisevi su kontrolnim životinjama uzimani svakodnevno, tokom dve nedelje pre žrtvovanja. U eksperiment su uključene samo one životinje koje su imale najmanje 2 regularna estrusna ciklusa. Na dan žrtvovanja ove životinje su se nalazile u različitim fazama estrusnog ciklusa. Pregled vaginalnih briseva kod neonatalno androgenizovanih životinja izveden je na dan žrtvovanja, budući da je njihov pregled zahtevao hirurško otvaranje vagine korišćenjem malih makaza. Saglasno sa nalazima drugih autora (Suzuki i sar., 1998; Watanobe i Habu, 2003), nalaz vaginalnog brisa je ukazivao na konstantni estrus kod svih životinja tretiranih testosteron enantatom. Histološka analiza tkiva jajnika pokazala je da su jajnici kontrolnih životinja sadržali folikule u različitim stadijumima sazrevanja, dok su jajnici životinja tretiranih testosteron enantatom bili policistični, uz upadljiv nedostatak žutih tela (podaci nisu prikazani).

### ***3.2.2. Hirurško uklanjanje jajnika***

Hirurško uklanjanje jajnika izvršeno je ženkama starosti 10 meseci koje su pokazivale znake reproduktivnog starenja.

Svakodnevni pregledom vaginalnih briseva tokom 2 nedelje, kod ženki pacova starosti 10 meseci konstatovan je perzistentan vaginalni estrus, što je u saglasnosti sa podacima koji ukazuju na to da reproduktivno starenje kod ženki pacova nastupa između 8 i 10 meseci starosti (Lu, 1983). Reproductivno starenje kod ženki pacova karakteriše postepeno produžavanja estrusne ili diestrus-2 faze ciklusa (Lu, 1983; Nass i sar., 1984), nakon čega se gubi estrusna cikličnost. Ova faza traje od 10 do 19 meseci i karakteriše je

perzistentni vaginalni estrus i povišen nivo estrogena (Lu, 1983). Nakon toga životinje ulaze u fazu koju karakterišu povišen nivo progesterona i perzistentni vaginalni diestrus i konačno anestrus (19-30 meseci) (Wise, 1982; Lu, 1983).

Bilateralno uklanjanje jajnika je vršeno u opštoj anesteziji (Sagatal, Rhône Mérieux, Ltd., Harlow, Velika Britanija; 60 mg/kg). Jajnici su uklanjani kroz mali rez na koži i mišićnom zidu, dorzo-lateralno, sa obe strane kičme. Rana je fiksirana hirurškim kopčama. Životinje su se nakon operacije oporavljale u individualnim kavezima, da bi narednog dana bile vraćene u prvobitne kaveze. „Lažno“ ovarijsktomisane životinje podvrgnute su istoj proceduri, uz manipulaciju jajnika, ali bez njihovog uklanjanja. Sve životinje su žrtvovane 30. dana nakon operacije.

Vaginalni brisevi su kontrolnim životinjama uzimani svakodnevno, tokom dve nedelje pre žrtvovanja i u eksperiment su uključene samo one životinje koje su imale perzistentni vaginalni estrus. Na autopsiji OVX životinje su pažljivo pregledane u cilju potvrde efikasnosti uklanjanja jajnika. Takođe, budući da je pokazano da estrogeni imaju ključnu ulogu u regulaciji debljine zida uterusa, a time i njegove težine (Frasor i sar., 2003b), uterusi su kod svih životinja pažljivo vađeni, razdvajani od okolnog vezivnog i masnog tkiva i mereni.

Periferna krv je dobijena punkcijom iz srca životinje u opštoj anesteziji (Sagatal, 60 mg/kg). Nakon toga životinje su žrtvovane postepenim povećanjem doze CO<sub>2</sub>. Sve životinje su žrtvovane između 9 i 10 časova pre podne. Timusi i slezine su pažljivo vađeni, razdvajani od okolnog tkiva, a potom je merena masa organa.

### ***3.2.3. Određivanje koncentracije gonadnih hormona u serumu životinja***

U cilju potvrde efikasnosti neonatalnog tretmana testosteronom, odnosno uklanjanja jajnika, određivane su koncentracije polnih hormona u uzorcima krvi, koji su dobijeni punkcijom iz srca životinje u opštoj anesteziji (Sagatal, 60 mg/kg). Kod kontrolnih, UT i NA ženki iz prve grupe eksperimenata određivan je nivo estradiola, progesterona i testosterona u serumu, a u serumu kontrolnih, OVX i sham-OVX ženki koncentracije estradiola i progesterona. Krv za analizu je ostavljena da koaguliše na sobnoj temperaturi, a

potom su serumi izdvajani centrifugiranjem na 400 x g u trajanju od 20 minuta, zamrznuti i čuvani na -20 °C do analize. Koncentracije progesterona i testosterona u serumu određivane su radioimunoesejom, korišćenjem komercijalnog testa za određivanje progesterona i testosterona (INEP Dijagnostika, Zemun, Srbija). Koncentracija estradiola je određivana hemiluminiscentnim enzimskim imunoesejom (Immulite, Euro/DPC, Velika Britanija) na analizatoru IMMULITE 1000. Sve procedure su izvedene prema uputstvima proizvođača.

### ***3.3. Hemikalije, antitela i imunokonjugati***

Testosteron enantat je nabavljen od Galenike A.D. (Zemun, Srbija).

Za određivanje koncentracije kateholamina korišćene su sledeće hemikalije: metanol (CH<sub>3</sub>OH) (Fluka Chemie AG Neu-Ulm, Švajcarska); perhlorna kiselina (HClO<sub>4</sub>) i natrijum tiosulfat (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (Merck, Darmstadt, Nemačka); kalijum dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), dinatrijumova so etilendiamin-tetrasirćetne kiseline (Na<sub>2</sub>-EDTA), heptansulfonska kiselina (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Nemačka) i standardi: noradrenalin (L-noradrenaline hydrochloride, Sigma-Aldrich Chemie), adrenalin ((±) adrenaline hydrochloride, Sigma-Aldrich Chemie) i 3,4-dihidroksibenzilamin (3,4-dihydroxybenzyleamine, DHBA, Aldrich, Steinheim, Nemačka).

Za tkivnu histofluorescencu korišćeni su: glioksalna kiselina, saharoza i glicin (Sigma-Aldrich Chemie).

Tkivo za imunocitohemijsku analizu je fiksirano u cink fiksativu (IHC zinc fixative, BD Biosciences Pharmingen, Mountain View, CA, USA) ili (10%) formalinu (Zorka Pharmacy, Šabac, Srbija). Za histološku analizu tkiva korišćeni su još i hematoksilin (Merck KgoA, Darmstadt, Nemačka), etanol p.a. (Alkaloid, Skopje, Makedonija) i ksilol (o-m-p- Ksilol, Zorka Pharmacy, Šabac).

Za imunohistohemijska bojenja tkiva korišćeni su: LSAB+ System HRP test, rastvor za demaskiranje epitopa (Target Retrieval Solution), rastvor za pravljenje razblaženja antitela (At) (Antibody Background Reducing Diluent), vodeni medijum za montiranje preparata (Aqueous Mounting Medium) i medijum za montiranje fluorescentnih



preparata (Fluorescent Mounting Medium), nabavljeni od DakoCytomation, Glostrup, Danska.

Za kultivisanje timocita korišćeni su: RPMI-1649 medijum bez indikatora fenol-crveno (engl. phenol red-free) obogaćen L-glutamin-om (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA SAD), penicilin (ICN, Costa Mesa, CA, SAD), streptomycin (ICN), natrijum piruvat (Serva, Heidelberg, Nemačka), N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-2-etansulfonska kislina, (HEPES) (Sigma-Aldrich Chemie) i fetalni teleći serum (engl. fetal calf serum, FCS) (Gibco, Grand Island, NY, SAD). FCS je inaktivisan zagrevanjem na 56°C u vodenom kupatilu 30 minuta. Takođe su korišćeni i natrijum azid (NaN<sub>3</sub>), konkanavalin A (engl. concanavalin a, ConA), Tween 20 i paraformaldehid nabavljeni od Sigma-Aldrich Chemie, kao i etilendiamin tetrasirćetna kiselina (EDTA) i goveđi serumski albumin (engl. bovine serum albumin, BSA) nabavljeni od Fluka AG (Chemie) GmbH (Buchs SG, Švajcarska).

Za analizu apoptotičnih ćelija *in situ* korišćen je aneksin V sa vezanim fluorescein izotiocijanatom (FITC) (BD Bioscience, Pharmingen, Nemačka). Za određivanje apoptotičnih timocita nakon 18-časovne kultivacije korišćen je Annexin V-FITC test za detekciju apoptoze (BD Bioscience, Pharmingen).

Za magnetno razdvajanje ćelija (engl. magnetic-activated cell sorting, MACS), na osnovu ekspresije površinskih antigena korišćeni su monoklonsko anti-CD4 (klon OX-38) At konjugovano sa MicroBeads česticama (Miltenil Biotec, Gladbach, Nemačka), anti-biotin MicroBeads čestice (Miltenil Biotec) i LS kolona (Miltenyi Biotec) uz odgovarajući magnetni separator (MACS separator) (Miltenyi Biotec).

Za obeležavanje membranskih i intracelularnih antigena korišćena su sledeća monoklonska At: anti-CD2 At (specifično za LFA-2) (klon OX-34) konjugovano fluorescein izotiocijanatom (FITC), anti-CD4 At (klon OX-38) konjugovano fikoeritriinom (PE) ili FITC-om, anti-CD45RC At (klon OX-22) konjugovano sa PE, anti-CD8 At (klon OX-8) konjugovano sa biotinom ili FITC-om, anti-CD25 At (klon OX-39) konjugovano sa biotinom, anti-TCR $\alpha\beta$  At (klon R73) konjugovano sa peridinin hlorofil proteinom (PerCP), anti-CD90 At (Thy-1.1) (klon OX-7) konjugovano sa PE ili PerCP, anti-CD3 At (klon G4.18) konjugovano sa PE, neobeleženo anti-androgeni receptor (AnR) At (klon G122-25),

neobeleženo anti-tirozin hidroksilaza (TH) At (klon TOH A1) kupljeni su od BD Biosciences Pharmingen, MountainView, CA, SAD. Anti-CD161 At (klon10/78) konjugovano sa FITC je kupljeno je od Serotec (Oxford, Velika Britanija). Neobeleženo anti-estrogeni receptor (ER)  $\alpha$  At (klon 1D5) je nabavljeno je od DakoCytomation. Monoklonsko mišje anti-pan citokeratin At (specifično za citokeratine tipa II: citokeratin 1, 5, 6, 8) (klon PCK-26) nabavljeno od Sigma-Aldrich Chemie. Poliklonsko kozje anti- $\alpha_{1B}$ -AR At i zečje anti- $\beta_2$ -AR At kupljeno je od Santa Cruz Biotechnology (CA, SAD).

Odgovarajuće izotipske kontrole kao i sekundarni reagensi: streptavidin konjugovan sa PE i PerCP, anti-mišji IgG anti-kozji IgG i anti-zečji IgG konjugovan sa FITC kupljeni su od BD Biosciences Pharmingen.

Za bojenje intracelularnog antigena FoxP3, korišćen je FoxP3 test koji sadrži anti-FoxP3 At konjugovano sa FITC (klon FJK-16s) nabavljeno od eBiosciences, San Diego, CA, SAD.

U cilju detekcije sinteze DNK, korišćen je propidijum jodid (engl. propidium iodide, PI) (Sigma-Aldrich Chemie) i bromodeoksiuridin (engl. 5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) komercijalni test (BD Biosciences Pharmingen).

Za analizu vijabiliteta ćelija korišćena je vitalna boja Tripan plavo (Sigma-Aldrich Chemie).

### ***3.4. Protočna fluorocitometrija***

#### ***3.4.1. Priprema ćelijskih suspenzija***

Nakon vađenja i merenja organa, timusno tkivo i tkivo slezine macerirano je između dva hladna predmetna stakalca i propuštanost kroz čeličnu mrežicu sa otvorima veličine 60  $\mu$ m u epruvetu sa hladnim rastvorom fosfatnog pufera (engl. phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.3) sa 2% FCS i 0.09%  $\text{NaN}_3$  (FCM pufer; engl. flow cytometry, FCM). Ovako dobijena ćelijska suspenzija je oprana 3 x u hladnom FCM puferu (300 x g, 5 minuta).

Uzorci krvi dobijeni su punkcijom iz srca životinje u opštoj anesteziji (Sagatal, 60 mg/kg). Liziranje eritrocita u suspenzijama ćelija periferne krvi i slezine izvršeno je dodavanjem odgovarajuće količine rastvora amonijum hlorida (NH<sub>4</sub>Cl). Nakon liziranja, ćelijske suspenzije oprane su 3 x u hladnom FCM puferu (300 x g, 5 minuta).

Bojenjem ćelija vitalnom bojom tripan plavo razlikovane su mrtve i žive ćelije. Žive ćelije su brojane u poboljšanoj Neubauer-ovoj komorici i suspenzije su podešavane tako da gustina ćelija bude  $1 \times 10^7$ /ml.

#### ***3.4.2. Priprema uzoraka za analizu ekspresije membranskih antigena***

Iz podešenih suspenzija ćelija (timocita, limfocita periferne krvi ili splenocita) u posebne epruvete je izdvojena zapremina u kojoj se nalazi  $1 \times 10^6$  ćelija i ćelije su istaložene centrifugiranjem (300 x g; 5 minuta).

Kada su korišćena At direktno obeležena fluorohromima, na talog ćelija dodavana su odgovarajuća At i inkubirana 30 minuta u mraku na +4°C. Po isteku inkubacije ćelije su 2 x prane FCM puferom i još jednom rastvorom PBS koji sadrži 0.09% NaN<sub>3</sub>, resuspendovane u PBS koji sadrži 0.09% NaN<sub>3</sub> i analizirane korišćenjem FCA.

Kada su korišćena At konjugovana biotinom ili neobeležena antitela, obeležavanje ćelija vršeno je u dva koraka (indirektno bojenje). Nakon inkubacije sa At konjugovanim sa biotinom ili neobeležanim antitelom (30 minuta, na +4°C u mraku), ćelije su prane 2 x FCM puferom, a zatim je na talog ćelija dodavan streptavidin konjugovan sa PerCP/odgovarajuće fluorohromom obeleženo antitelo i ćelije su još jednom inkubirane 30 minuta na +4°C u mraku. Nakon inkubacije, pranje, resuspendovanje i analiza ćelija izvođeni su na isti način kao nakon direktnog bojenja.

#### ***3.4.3. Priprema uzoraka za analizu ekspresije intracelularnih antigena***

Iz podešenih suspenzija ćelija timocita,  $1 \times 10^6$  ćelija je izdvajano u epruvete, istaloženo centrifugiranjem (300 x g; 5 minuta) i oprano rastvorom PBS koji sadrži 0.09% NaN<sub>3</sub>.

Prilikom obeležavanja ćelija koje ispoljavaju TH ili  $\beta_2$ -AR, ćelije su nakon pranja fiksirane ledenim rastvorom 0.25% paraformaldehida, u trajanju od 30 minuta, na temperaturi +4°C u mraku. Fiksirane ćelije su zatim 2 x oprane hladnim FCM puferom i permeabilizovane dodavanjem 0.5 ml 0.2% Tween 20 u PBS, u trajanju od 15 minuta na temperaturi +4°C u mraku. Nakon permeabilizacije membrane, ćelije su centrifugirane, na talog su dodavana odgovarajuća neobeležena At (anti-TH ili anti- $\beta_2$ -AR ) i inkubirane 30 minuta na +4°C, u mraku. Nakon inkubacije, ćelije su prane 2 x rastvorom 0.1% Tween 20 u PBS, a zatim je na talog dodavano odgovarajuće fluorohromom obeleženo sekundarno At (anti-miš IgG:FITC za obeležavanje TH i anti-zec IgG:FITC za obeležavanje  $\beta_2$ -AR). Nakon inkubacije (30 minuta na +4°C u mraku) ćelije su prane 2 x FCM puferom, jednom u PBS koji sadrži 0.09%  $\text{NaN}_3$  rastvoru, resuspendovane u PBS koji sadrži 0.09%  $\text{NaN}_3$  i analizirane korišćenjem FCA.

Prilikom obeležavanja ćelija koje ispoljavaju  $\text{ER}\alpha$  ili AnR, ćelije ( $1 \times 10^6$  ćelija) su nakon pranja fiksirane i permeabilizovane dodavanjem 0.5 ml 75% hladnog rastvora metanola u PBS u trajanju od 30 minuta, na temperaturi +4°C, u mraku. Fiksirane i permeabilizovane ćelije su zatim oprane sa 0.5 ml hladnog PBS, a zatim je na talog dodavana odgovarajuća neobeležena At (anti- $\text{ER}\alpha$  ili anti-AnR) i ćelije su inkubirane 30 minuta na +4°C, u mraku. Nakon inkubacije ćelije su prane 2 x sa 0.5 ml hladnog PBS, a zatim je na talog dodavano fluorohromom obeleženo sekundarno At (anti-miš IgG:FITC). Nakon inkubacije od 30 minuta na +4°C u mraku, ćelije su prane 2 x sa 0.5 ml hladnog PBS, resuspendovane u PBS i analizirane korišćenjem FCA.

Obeležavanje ćelija koje ispoljavaju FoxP3 transkripcioni faktor vršeno je prema uputstvu proizvođača. Nakon bojenja površinskih antigena, ćelije su fiksirane i permeabilizovane upotrebom odgovarajućih reagenasa iz komercijalnog testa i nakon toga inkubirane sa fluorohromom obeleženim anti-FoxP3 At. Nakon inkubacije od 30 minuta na +4°C u mraku, ćelije su prane 2 x komercijalnim rastvorom, resuspendovane u PBS i analizirane korišćenjem FCA.

#### **3.4.4. Magnetno razdvajanje ćelija na osnovu ekspresije površinskih antigena**

Kako bi se dobila obogaćena populacija najnezrelijih (CD4-CD8- DN) timocita, iz pripremljene suspenzije ćelija uklonjene su CD4+ i CD8+ ćelije, korišćenjem MACS.

Iz podešene suspenzije timocita,  $1 \times 10^7$  ćelija je izdvajano u epruvete, istaloženo centrifugiranjem (300 x g; 5minuta) i resuspendovano u 100  $\mu$ l rastvora PBS koji je sadržao 0.5% BSA i 2mM EDTA (MACS pufer). U ćelijsku suspenziju dodato je 10  $\mu$ l anti-CD8 At konjugovanog sa biotinom i ćelije su inkubirane 30 minuta na temperaturi +4°C. Nakon inkubacije ćelije su 2 x prane sa 1ml hladnog MACS pufera, a zatim je na talog dodavano 20  $\mu$ l anti-CD4 At konjugovanog sa MicroBeads česticama i 20  $\mu$ l anti-biotin MicroBeads čestica i ćelije su inkubirane 15 minuta na temperaturi +4°C. Nakon inkubacije, ćelije su 1 x oprane sa 1 ml MACS pufera, istaložene centrifugiranjem (300 x g; 5 minuta) i resuspendovane u 0.5 ml MACS pufera. Suspenzija ćelija obeleženih MicroBead česticama propuštana je kroz LS kolonu smeštenu, prema uputstvu proizvođača, u magnetnom polju odgovarajućeg MACS separatora. Obeležene ćelije (CD4+CD8+ ćelije) zadržavale su se na koloni, dok su neobeležene ćelije, nakon prolaska kroz kolonu, sakupljane i prema prethodno opisanoj proceduri, dalje pripremane za analizu ekspresije membranskih antigena (CD2/CD45RC/TCR $\alpha\beta$ ) i analizu korišćenjem FCA.

Za fenotipsku karakterizaciju timocita korišćene su kombinacije At sledeće specifičnosti:

- CD4/CD8/TCR $\alpha\beta$
- CD2/CD45RC/TCR $\alpha\beta$
- CD90/TCR $\alpha\beta$
- CD4/CD25/FoxP3
- CD161/TCR $\alpha\beta$
- ER $\alpha$
- AnR
- TH
- $\alpha_{1B}$ -AR
- $\beta_2$ -AR

Za fenotipsku karakterizaciju T-limfocita periferne krvi i slezine korišćene su kombinacije At sledeće specifičnosti:

- CD4 ili CD8 i CD90/CD45RC
- CD4/CD8/TCR $\alpha\beta$
- CD4/CD25/FoxP3
- CD161/TCR $\alpha\beta$

### ***3.4.5. Analiza uzoraka protočnom fluorocitometrijom***

Za analizu uzoraka suspenzije timocita, T-limfocita periferne krvi i slezine protočno-fluorocitometrijskom metodom, korišćen je citometar FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD) sa argonskim jonskim laserom talasne dužine 488 nm. Na ovom aparatu, nakon hidrodinamičkog fokusiranja, svaka ćelija prolazi kroz laserski snop poreklom od argonskog lasera. Detektor, koji se nalazi u istoj ravni kao i laserski snop, beleži prednje rasipanje svetlosti (engl. forward scatter channel, FSC), koje daje podatak o veličini ćelija. Detektor bočnog rasipanja svetlosti (engl. side scatter channel, SSC) daje podatke o granuliranosti, odnosno o unutrašnjoj strukturi ćelija. Obeležavanjem površinskih ili intracelularnih antigena ćelija fluorohromima obeleženim At koja, pobuđena laserskim zrakom, emituju svetlost određene talasne dužine, uz informaciju o veličini i granuliranosti ćelija, dobijaju se informacije o zastupljenosti ćelija koje ispoljavaju ispitivane antigene, kao i o gustini njihove ekspresije. U eksperimentima su korišćeni FITC, PE i PerCP fluorohromi, čiji ekscitacioni spektar obuhvata talasnu dužinu od 488 nm, a njihovi emisijski spektri su takvi (maksimumi emisije: FITC-530 nm, PE-585 nm, PerCP-650 nm), da se mogu razdvojiti i istovremeno detektovati, uz minimalan gubitak intenziteta emitovane svetlosti.

Po uzorku je učitavano 20 000 ćelija. Nespecifične IgG izotipske kontrole su korišćene u cilju definisanja nespecifičnog bojenja, a mrtve ćelije i delovi ćelija (ćelijski debris) su isključeni iz analize na osnovu veličine (FSC) i granuliranosti (SSC) ćelija. Procenat pozitivnih ćelija i procena srednjeg intenziteta fluorescence za svako

fluorohromima obeleženo antitelo određivani su korišćenjem kompjuterskog programa CellQuest (Becton Dickinson).

Analiza ekspresije CD90, AnR, ER $\alpha$ ,  $\alpha_{1B}$ -AR i  $\beta_2$ -AR na/u timocitima uključivala je i merenje srednjeg intenziteta fluorescence (engl. mean fluorescence intensity, MFI), koju emituju fluorohromi vezani za At specifična za ove molekule, a koja odražava gustinu njihove ekspresije. Procenat promene MFI je izračunat prema jednačini (Kamath i sar., 1998):

$$\% \text{ promene MFI} = \frac{[(\text{MFI eksperimentalne grupe} - \text{MFI kontrolne grupe}) \times 100]}{\text{MFI kontrolne grupe}}$$

### ***3.5. Određivanje apoptotičnih ćelija u kulturi***

Osetljivost timocita na apoptotske signale ispitivana je nakon 18-časovne kultivacije timocita izolovanih iz životinja različitih kontrolnih i eksperimentalnih grupa. Budući da je pokazano da pH indikator fenol-crveno ispoljava estrogeno delovanje (Berthois i sar., 1986), za kultivaciju ćelija korišćen je RPMI 1640 medijum bez fenol-crveno pH indikatora. Timociti su kultivisani u pločama sa ravnim dnom sa 96 bazena (Nunc A/S, Roskilde, Danska) na 37°C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. U svaki bazen je nalivano 2 x 10<sup>5</sup> ćelija u ukupnoj zapremini od 200  $\mu$ l.

Procenat apoptotičnih ćelija nakon 18-časovne kultivacije određivan je korišćenjem Aneksin V-PI komercijalnog testa. U početnoj fazi apoptoze, fosfatidilserin se iz unutrašnjeg izmešta u spoljašnji sloj fosfolipidnog dvosloja membrane (Vermees i sar., 1995). Aneksin V se specifično vezuje za fosfatidilserin i pokazuje minimalno vezivanje za fosfatidilholin i sfingomijelin, koji su normalno locirani na spoljašnjoj strani ćelijske membrane (Vermees i sar., 1995). PI je vitalna boja, koja ne prolazi kroz ćelijsku membranu živih ćelija. Kada je integritet ćelijske membrane narušen, PI ulazi u ćeliju i stehiometrijski se vezuje za nukleinske kiseline (jedan molekul boje na 4.5 baznih parova). Ovaj molekul nakon ekscitacije laserom talasne dužine 488 nm emituje svetlost talasne dužine između 562-588 nm, a nakon vezivanja za DNK emisiona talasna dužina se pomera 15 nm ka

plavom delu spektra. Istovremenim bojenjem suspenzije ćelija aneksinom V obeleženim sa FITC i PI mogu se razdvojiti: 1) žive ćelije, koje ne vezuju ni aneksin V ni PI (AneksinV-/PI-), 2) ćelije u ranoj (Aneksin V+/PI-) i 3) ćelije u kasnoj fazi apoptoze koje vezuju i aneksin V i PI (Aneksin V+/PI+) (Vermees i sar., 1995).

Nakon kultivisanja, ćelije su prebacivane u epruvete, centrifugirane (300 x g, 5 minuta) i 2 x prane u hladnom PBS. U 100 µl suspenzije timocita (koncentracije  $1 \times 10^5$ /ml) dodavano je 100 µl komercijalnog pufera, a zatim 5 µl aneksina V konjugovanog sa FITC i 5 µl PI. Nakon blagog mešanja, ćelije su inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije dodavano je 400 µl komercijalnog pufera i uzorci su analizirani na protočnom citometru.

### **3.6. Analiza ćelijskog ciklusa**

#### **3.6.1. Određivanje sadržaja DNK upotrebom PI**

Kako se količina DNK u različitim fazama ćelijskog ciklusa menja, upotrebom boja koje se vezuju za nukleinske kiseline uz korišćenje FCA moguće je kvantifikovati količinu DNK u ćelijama, a time i raspodelu po fazama ćelijskog ciklusa (Moore i sar., 1998).

Za obeležavanje i kvantifikaciju DNK u sveže izolovanim suspenzijama timocita, korišćen je PI (Sigma).

Iz podešenih suspenzija timocita,  $1 \times 10^6$  ćelija je izdvajano u epruvete, istaloženo centrifugiranjem (300 x g; 5 minuta) i 1 x oprano rastvorom PBS koji sadrži 0.09%  $\text{NaN}_3$ . Kako su membrane živih ćelija nepropustljive za PI, ćelije su fiksirane i permeabilizovane dodavanjem 0.5 ml hladnog apsolutnog etanola u trajanju od 12 h, na  $+4^\circ\text{C}$ . Nakon toga ćelije su centrifugirane 10 minuta na 1000 rpm/ $4^\circ\text{C}$  i supernatant je odliven. Budući da se PI nespecifično vezuje za nukleinske kiseline, na talog ćelija dodato je 0.25 ml rastvora ribonukleaze-A (1mg/ml) (Sigma) i ćelije su inkubirane 20 minuta na  $37^\circ\text{C}$  u vodenom kupatilu radi uklanjanja RNK.



Nakon toga, suspenzije ćelija su bojene sa po 0.25 ml rastvora PI (40  $\mu$ l/ml), u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Vezivanje PI je analizirano korišćenjem FCA. Analizom intenziteta fluorescence PI razdvojene su: 1) ćelije sa nižim sadržajem DNK, koje odgovaraju apoptotičnim ćelijama (subG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>); 2) ćelije sa normalnim sadržajem DNK, koje odgovaraju ćelijama u fazi mirovanja, odnosno ćelijama koje se pripremaju za ćelijsku deobu (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>); 3) ćelije sa povećanim sadržajem DNK, odnosno ćelije u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa koje obuhvataju: ćelije koje udvajaju DNK (S), ćelije sa udvostručenim sadržajem DNK (G<sub>2</sub>), kao i ćelije u procesu ćelijske deobe (M). Splepljene ćelije isključivane su prilikom analize vezivanja PI upotrebom modula za razdvajanje dubleta (engl. doublet discriminating module, DDM).

### ***3.6.2. Ispitivanje sinteze DNK na osnovu ugradnje BrdU u kulturi timocita***

Bromodeoksiuridin (BrdU) je analog timidina i koristi se za ispitivanje sinteze DNK u ćelijama. Iz suspenzija ćelija koncentracije  $2 \times 10^6$  ćelija/ml, 100  $\mu$ l je nalivano u bazene ploča sa ravnim dnom (96 bazena) (Nunc A/S). Za merenje spontane proliferacije timocita u bazene je dodavano 100  $\mu$ l medijuma, dok je proliferacija timocita u prisustvu mitogena (ConA) ispitivana dodavanjem 100  $\mu$ l medijuma u koji je dodat ConA, tako da je njegova finalna koncentracija u ukupnoj zapremini od 200  $\mu$ l po bazenu bila 2.5  $\mu$ g/ml. Ćelije su inkubirane 48 h na 37°C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Osamnaest sati pre završetka inkubacije, u sve bazene je dodavan 1  $\mu$ M BrdU.

Za detekciju ugrađenog BrdU korišćen je komercijalni BrdU/7-AAD test (BD Biosciences Pharmingen). Procedura bojenja je izvedena prema uputstvu proizvođača. Ćelije su iz ploče za kulturu prebačene u epruvete, izbrojane i izdvojena je zapremina, koja sadrži  $1 \times 10^6$  ćelija. Ćelije su oborene centrifugiranjem i na talog je dodat komercijalni rastvor za permeabilizaciju. Nakon permeabilizacije, ćelije su fiksirane dodavanjem odgovarajućeg reagensa iz testa i potom inkubirane sa rastvorom enzima DNAze u cilju dobijanja jednolančanih molekula DNK. Nakon toga ćelije su inkubirane sa anti-BrdU At u trajanju od 30 minuta na 4°C u mraku. Ćelije su 2 x prane komercijalnim puferom i

neposredno pred analizu u suspenziju je dodat 7-AAD. Uzorci su analizirani korišćenjem FCA. Spleljene ćelije isključivane su prilikom analize upotrebom DDM.

### ***3.7. Imunohistohemijsko i histohemijsko bojenje tkiva***

#### ***3.7.1. Identifikacija i karakterizacija ćelija koje ispoljavaju tirozin hidrosilazu i citokeratine***

Za obeležavanje ćelija koje ispoljavaju TH i citokeratine primenjeno je imunohistohemijsko bojenje. Tkivo timusa fiksirano je u 10% formalinu odnosno cink fiksativu (za imunochemijsko bojenje ćelija koje ekspimiraju TH), ukalupljeno i preseći debljine 5 µm sečeni su na mikrotomu (Leica RM 2155, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Germany). Nakon što su tkivni preseći deparafinisani u ksilolu, a zatim hidratisani u seriji alkohola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%), antigeni su demaskirani inkubacijom (21 minuta) u komercijalnom rastvoru za demaskiranje epitopa (pH 6) (DakoCytomation) u mikrotalasnoj pećnici (700W), a potom je aktivnost endogenih enzima (alkalna fosfataza, peroksidaza, pseudoperoksidaza) blokirana inkubacijom sa 3% vodenim rastvorom vodonik peroksida u trajanju od 5 minuta, na sobnoj temperaturi.

Za identifikaciju ćelija koje ispoljavaju TH i citokeratin korišćen je Universal LSAB+ HRP test (DakoCytomation). Tkivni preseći su nakon blokiranja endogenih enzima inkubirani u vlažnoj komori sa anti-TH At (1:500) ili anti-pan-citokeratin (1:300) At, na 4°C, preko noći. Za pravljenje razblaženja At korišćen je komercijalni rastvarač (DakoCytomation), a za ispiranje preparata korišćen je PBS (pH 7.4). Nakon ispiranja, preseći su inkubirani sa univerzalnim biotinizovanim linkom i streptavidinom konjugovanim sa peroksidazom rena (engl. horseradish peroxidase, HRP), u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Između inkubacija preparati su 3 x ispirani u PBS u trajanju od 5 minuta. Nakon poslednjeg ispiranja, preseći su inkubirani sa rastvorom supstrat-hromogen (3,3'-diamino benzidin, DAB+ hromogen) u trajanju od 5

minuta, na sobnoj temperaturi. Tkivo je kontrastirano Mayer-ovim hematoksilinom i nakon ispiranja i odlivanja tečnosti preseći su prekriveni komercijalnim vodenim medijumom za montiranje (DakoCytomation) i pokrovnom ljusticom i analizirani korišćenjem Olympus BH2-RFL mikroskopa (Olympus Optical C.O., Ltd, Tokyo, Japan) sa digitalnom kamerom (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions) i programom za analizu AnalySIS FIVE (Olympus Soft Imaging Solutions).

Površina koju zauzimaju ćelije koje eksprimiraju citokeratin dobijena je kvantifikacijom piksela braon boje, koji označavaju DAB obojene imunoreaktivne (citokeratin+ ) ćelije, korišćenjem Image J programa, kao što je prethodno opisano (Boehm sar., 2003), na ukupno 40 mikrografija, površine  $0.036 \text{ mm}^2$  dobijenim nasumičnim postavljanjem mikroskopskih polja u spoljašnjem i unutrašnjem korteksu (uključujući i KMZ) i meduli timusa. U analizu je uključen jednak broj mikrografija svakog odeljka timusa. Pet preseka timusa analizirano je od svake životinje. Nakon izračunavanja ukupnog broja piksela po jedinici površine, udeo imunoreaktivnih ćelija izražen je kao % od ukupne analizirane površine.

Ćelije koje ispoljavaju TH brojane su pod uveličanjem  $\times 40$  na ukupno 30 mikroskopskih polja, površine  $0.036 \text{ mm}^2$ , nasumično postavljenih u spoljašnjem i unutrašnjem korteksu (uključujući i KMZ) i meduli timusa. Jednak broj mikroskopskih polja postavljen je u svakom odeljku timusa. Analizirana su po 3 preseka timusa od svake životinje. Nakon računanja ukupne analizirane površine u svakom odeljku timusa broj imunoreaktivnih ćelija izražen je kao broj TH+ ćelija/  $\text{mm}^2$ .

### ***3.8. Određivanje apoptotičnih ćelija na presecima tkiva***

Identifikacija apoptotičnih ćelija *in situ* vršena je analizom vezivanja FITC obeleženog aneksina V na presecima timusnog tkiva. Nakon deparafinizacije i rehidratacije tkivni preseći su inkubirani sa FITC-obeležanim aneksinom V (1:300) u trajanju od 60 minuta, na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. Nakon inkubacije, preseći su 3 x oprani u PBS, prekriveni komercijalnim medijumom za montiranje fluorescentnih preparata

(DakoCytomation) i pokrovnom ljupticom i analizirani korišćenjem Olympus BH2-RFL mikroskopa (Olympus Optical) opremljenog sa fluorescentnom lampom, digitalnom kamerom (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions) i programom za analizu AnalySIS FIVE (Olympus Soft Imaging Solutions). Čelije koje su vezale aneksin V brojane su pod uveličanjem  $\times 40$  na ukupno 30 mikroskopskih polja, površine  $0.036 \text{ mm}^2$ , nasumično postavljenih u spoljašnjem i unutrašnjem korteksu (uključujući i KMZ) i meduli timusa. Jednak broj mikroskopskih polja postavljen je u svakom odeljku timusa. Pet preseka timusa analizirano je od svake životinje. Nakon računanja ukupne analizirane površine u svakom odeljku timusa broj apoptotičnih ćelija izražen je kao broj aneksin V+ ćelija/ $\text{mm}^2$ .

### ***3.9. Identifikacija monoamina upotrebom saharoza-kalijumfosfat-glioksalne kiseline***

Za identifikaciju monoaminergičnih nervnih vlakana u timusu pacova *in situ*, korišćena je modifikovana metoda (Mičić i sar., 1994) za identifikaciju monoamina upotrebom saharoza-kalijumfosfat-glioksalne kiseline (engl. sucrose-potassium phosphate-glyoxylic acid, SPG) (Qayyum i Fatani, 1985).

Neposredno nakon vađenja i merenja timusa, deo tkiva je zamrzavan u tečnosti za zamrzavanje (Kilik, BioOptica, Milano, Italija) i čuvan na  $-70^\circ\text{C}$  do analize. Na kriokatu (Kryocut E, Reichart-Jung, Austrija) sečeni su preseci timusnog tkiva, debljine  $20 \mu\text{m}$  na pet različitih nivoa tkiva. Odmah po sečenju, preseci su uranjeni u rastvor PBS (pH 7.4) koji je sadržao: 1% glioksalne kiseline, 0.2 M saharoze i 0.236 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (SPG rastvor). Nakon desetominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, višak tečnosti je odliven i preseci su sušeni ujednačenom strujom hladnog vazduha (fen). Na osušene preparate je nanošena po kap mineralnog ulja (glicin/glicerol pufer), a zatim su inkubirani 2.5 minuta u termostatu na  $95^\circ\text{C}$ . Nakon odlivanja mineralnog ulja, preseci su prekrivani pokrovnom ljupticom pomoću glicinskog pufera (90 delova glicina/10 delova PBS) (pH 8). Istog dana timusni preseci su analizirani na mikroskopu Olympus BH2-RFL (Olympus Optical) opremljenim sa fluorescentnom lampom, korišćenjem eksitacionog (BP-405) i barijernog (Y-495) filtera

i fotografisani digitalnom kamerom (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Nemačka). Za analizu preparata je korišćen kompjuterski program AnalySIS FIVE (Olympus Soft Imaging Solutions).

Budući da je pokazano da populacije ćelija, locirane uglavnom u KMZ timusa pacova i koje prema morfologiji odgovaraju makrofagama, mogu sadržati granule autofluorescentnog lipofuscina (Milićević i sar., 1986), za svaki presek timusa korišćena je odgovarajuća kontrola (sukcesivni presek timusa koji je umesto SPG rastvorom prekriven mineralnim uljem).

Intenzitet fluorescence svakog izdvojenog fluorescentnog vlakna i autofluorescentne ćelije kvantifikovan je korišćenjem Image J programa, nakon konverzije slike u crno/belu (engl. gray scale), kao što je prethodno opisano (Brunet i sar., 2005), a intenzitet fluorescence je izražavan kao vrednost intenziteta piksela po jedinici površine. Korekcija u odnosu na fluorescencu pozadine vršena je tako što je intenzitet fluorescence pozadine kvantifikovan pomeranjem obrisa odgovarajuće strukture, na mesto bez fluorescentnih vlakana ili ćelija i tako izmerena vrednost piksela po jedinici površine oduzimana je od vrednosti dobijene merenjem fluorescentnih nervnih vlakana ili ćelija. Dobijene vrednosti za intenzitet fluorescence nervnih vlakana i autofluorescentnih ćelija na presecima timusnog tkiva eksperimentalnih životinja normalizovane su u odnosu na odgovarajuće vrednosti kontrolnih životinja i tako prikazane.

Procentualna zastupljenost fluorescentnih nervnih vlakana merena je na 10 nasumično odabranih polja sa 5 preseka timusnog tkiva po životinji korišćenjem stereološke mrežice, kao što je prethodno opisano (Wernli i sar., 2009), a dobijena vrednost izražavana je kao procenat površine vidnog polja koji zauzimaju fluorescentna nervna vlakna.

Gustina fluorescence velikih autofluorescentnih ćelija analizirana je pod uveličanjem  $\times 40$  na vidnom polju veličine  $0.027 \text{ mm}^2$ , na 30 nasumično postavljenih mikroskopskih polja, na 10 preseka timusnog tkiva po životinji. Nakon računanja veličine ukupne analizirane površine gustina fluorescentnih ćelija je izražena kao broj fluorescentnih ćelija/ $\text{mm}^2$ .

### ***3.10. Određivanje koncentracije kateholamina reverzno-faznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (RP HPLC)***

#### ***3.10.1. Priprema uzoraka za RP HPLC***

Sadržaj kateholamina određivan je u ekstraktima timusnog tkiva. Za određivanje koncentracije kateholamina u tkivu timusa reverzno-faznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (engl. reverse-phase high performance liquid chromatography, RP HPLC), neposredno nakon vađenja i merenja organa jedan deo organa je zamrzavan i čuvan na  $-70^{\circ}\text{C}$  do analize. Neposredno pre analize uzorci su odmrznuti i tkivo je homogenizovano u 600  $\mu\text{l}$  hladnog rastvora 0.4M  $\text{HClO}_4$  sa 0.15%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  i 0.05%  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ . Homogenat tkiva je centrifugiran 20 minuta na  $30\,000 \times g$  i izdvojeni su supernatanti koji su korišćeni za analizu. Neposredno pre analize uzorci su filtrirani kroz 0.2  $\mu\text{m}$  filtre radi uklanjanja eventualno zaostalih nečistoća.

#### ***3.10.2. Određivanje koncentracije kateholamina RP HPLC metodom***

Sistem za tečnu hromatografiju sastoji se od dve faze, stacionarne koju predstavlja porozni materijal koji se nalazi u koloni i mobilne, koju predstavlja tečnost u kojoj se vrši hromatografsko razdvajanje i koja pod pritiskom kontinuirano protiče kroz sistem. Metoda reverzno-fazne tečne hromatografije podrazumeva da je mobilna faza polarna, dok je stacionarna faza nepolarna.

Za kvantifikaciju kateholamina korišćena je aparatura koja se sastoji od pumpe (HPLC pumpa LC 1120, GBC, Victoria, Australija) i elektrohemijskog detektora (elektrohemijski detektor LC 1260, GBC, Victoria, Australija). Hromatografsko razdvajanje vršeno je korišćenjem kolone (Hibar® RT 125-4 Pre-packed column LiChrosphere® 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ), Merck) i mobilne faze sledećeg sastava: 0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 0.1mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  i 4%  $\text{CH}_3\text{OH}$ , (pH 4.6).

Količina od 20 µl od svakog uzorka ubrizgavana je u brizgalicu HPLC pumpe. Protok mobilne faze bio je podešen na 1 ml/minuta, napon detektora na 0.7 V, a osetljivost elektrohemijskog detektora na 5 nA. Standardne krive su napravljene puštanjem različitih koncentracija odgovarajućih standardnih rastvora noradrenalina i adrenalina (L-noradrenalin hidrohlorida i (±) adrenalin hidrohlorida). Koncentracija kateholamina u timusnom tkivu određivana je pomoću standardne krive uz korišćenje kompjuterskog programa WinChrom Chromatography data system v. 1.3 (WinChrom Chromatography data system version 1.3, Licenced for GBC Scientific Equipment Pty Ltd). Dobijene vrednosti izražene su na g mase timusnog tkiva.

### ***3.11. Analiza ekspresije gena za IL-6 i IL-7 u timusu***

#### ***3.11.1. Izolacija ukupne RNK***

Tkivo timusa je neposredno nakon merenja zamrzavano u 2 x koncentrovanom puferu za liziranje (Lysis Buffer, komercijalni rastvor) i do analize čuvano na -70 °C. Neposredno pred izolaciju tkivo je odmrzavano i homogenizovano u (razblaženom) puferu za liziranje. Pre izolacije ukupne ribonukleinske kiseline (RNK), homogenat tkiva timusa (150 µl) je prefiltriran uz korišćenje ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) prema uputstvu proizvođača radi uklanjanja grubljih nečistoća (kolagenog i fibroznog materijala). Izolacija ukupne RNK obavljena je na sobnoj temperaturi iz prefiltriranog homogenata tkiva timusa uz korišćenje ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation i komercijalnih reagenasa (Total RNA Chemistry, Applied Biosystems) (Wash Solution 1, 2 i Elution Solution) prema uputstvu proizvođača (biranjem RNA Tissue-Filtr-DNA metode). Izolovana RNK prečišćena je od proteina, nukleaza i drugih nečistoća.

### **3.11.2. Transkripcija RNK u cDNK**

Nakon izolacije ukupne RNK komplementarna DNK (cDNK) je sintetisana korišćenjem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) na aparatu Applied Biosystems 7500 prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša je sadržala: 10 µl uzorka, 2 µl 10 x pufera za reverznu transkripciju (RT Buffer), 0.8 µl mešavinu nukleotida (25 x dNTP Mix) (100 mM), 2 µl nasumičnih prajmera (10 x RT Random Primers), 1 µl reverzne transkriptaze (MultiScribe Reverse Transcriptase), 1 µl inhibitor RNaze (RNase inhibitor), 3.2 µl vode (Nuclease-free H<sub>2</sub>O). Reakcija transkripcije RNK se odvija 10 minuta na temperaturi od 25 °C, nakon čega sledi 120 minuta na 37 °C, 5 sekundi na 85 °C i hlađenje na 4 °C. Posle transkripcije RNK u cDNK urađena je kvantifikacija ekspresije gena metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. real time polymerase chain reaction, RT-PCR).

### **3.11.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu**

RT-PCR je metoda koja kombinuje konvencionalnu PCR amplifikaciju i fluorimetriju specifične, fluorescentnim bojama obeležene probe. Za jedan kraj dvostruko obeleženih proba vezana je boja koja se označava kao donor, a za drugi kraj akceptorska boja. Nakon što je osvetljen svetlošću diode, donor emituje svetlost koju apsorbuje akceptor. Pošto *Taq* polimeraza ima i 5' egzonukleaznu aktivnost, tokom faze elongacije u PCR reakciji dolazi do isecanja proba, a time i do odvajanja donora i akceptora, što se otkriva kao povećanje fluorescencije donora koja se registruje detektorom (Cikota i sar., 2002).

PCR reakcije su rađene na aparatu Applied Biosystems 7500, u finalnoj zapremini od 25 µl koja je sadržala: Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) i cDNA. Uzorci su analizirani uz pomoć eseja specifičnog za IL-6 (Rn99999011\_m1, Applied Biosystems) i IL-7 (Rn00681900\_m1, Applied Biosystems). Budući da je pokazao stabilan nivo ekspresije u tkivu timusa različitih kontrolnih i eksperimentalnih životinja, esej specifičan za β-aktin



(Rn00667869\_m1) korišćen je u svojstvu endogene kontrole. Svi uzorci su rađeni u triplikatu.

Uslovi reakcije bili su sledeći:

- 2 minuta na 50 °C,
- 10 minuta na 95 °C,
- 40 ciklusa po 15 sekundi na 95 °C,
- 1 minut na 60 °C.

Kvantitativne vrednosti su dobijane iz broja ciklusa (Ct vrednosti) u kome je porast signala iznad nivoa šuma (engl. threshold), udružen sa ulaskom u eksponencijalnu fazu PCR koji detektuje analitički softver aparata (Applied Biosystems SDS software v1..4.0.). Relativna ekspresija ispitivanih iRNK za IL-6 i IL-7 je izražavana u odnosu na kalibrator. Uzorci kontrolne grupe objedinjeni su i korišćeni kao kalibrator. Konačan rezultat je izražavan u relativnim jedinicama kao N-puta razlika u odnosu na kalibrator (normalizovan prema  $\beta$ -aktinu), prema formuli:

$$N_{uzorka} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

gde je:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{uzorka} - \Delta Ct_{kalibratora}$$

$$\Delta Ct_{uzorka} = Ct_{cilj.trans.} - Ct_{\beta-aktin}$$

$$\Delta Ct_{kalibratora} = Ct_{cilj.trans.} - Ct_{\beta-aktin}$$

poređenje ddCT vrednosti, između životinja

### **3.12. Statistička obrada rezultata**

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (engl. standard error of the mean, S.E.M.). Statistička značajnost razlika između grupa je testirana neparametarskim Mann-Whitney testom uz pomoć statističkog kompjuterskog programa SPSS for Windows 16.0. i GraphPad Prism v 5.0. *P* vrednost  $< 0.05$  je smatrana statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Uticaj jednokratnog davanja testosterona u kritičnom neonatalnom periodu na timus odraslih ženki pacova

#### 4.1.1. Koncentracija estradiola, progesterona i testosterona u serumu

Kako bi se potvrdila efikasnost tretmana testosteronom u kritičnom neonatalnom uzrastu, koncentracija estradiola, progesterona i testosterona je određivana u serumima odraslih ženki pacova neonatalno tretiranih testosteronom, kao i u serumima kontrolnih životinja istog uzrasta. Kako se koncentracija ni jednog od analiziranih hormona nije značajno razlikovala između intaktnih i uljem tretiranih životinja (UT), ove dve grupe su u svim narednim analizama i prikazima tretirane kao jedna grupa. Kao što je očekivano, na osnovu podataka iz prethodnih studija (Weisz i Lloyd, 1965; Gerall i Kenny, 1970), jednokratno ubrizgavanje testosterona ženkama pacova u kritičnom neonatalnom uzrastu (neonatalna androgenizacija) imalo je za posledicu hiperestrogenemiju i hipoprogestronemiju, kao i povećanje koncentracije testosterona u serumu (Tabela 1).

**Tabela 1. Koncentracija estradiola, progesterona i testosterona u serumu neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih životinja (Kontrola).**

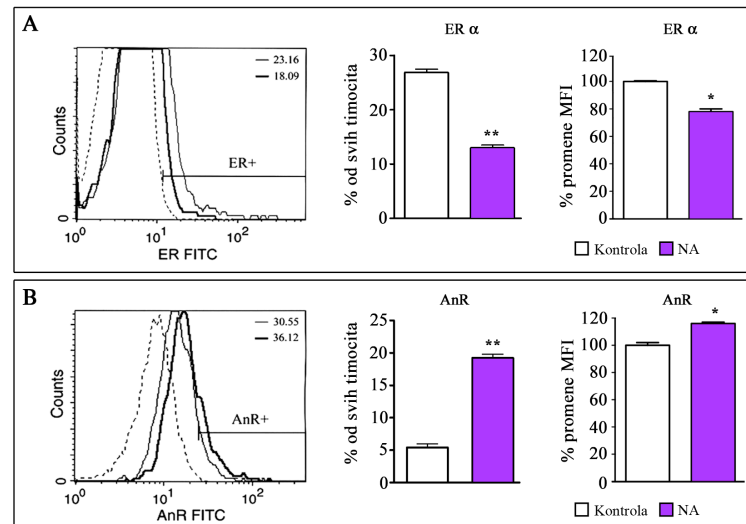
| Grupa                  | Estradiol<br>( pg/ml ) | Progesteron<br>( nmol/ml ) | Testosteron<br>( ng/ml ) |
|------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>Kontrola (n=11)</b> | 66.15 ± 2.59           | 32.88 ± 3.85               | 0.20 ± 0.01              |
| <b>NA (n=6)</b>        | 95.08 ± 9.23**         | 13.98 ± 3.42**             | 0.57 ± 0.02*             |

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. \*p<0.05;\*\*p<0.01.

#### 4.1.2. Receptori za polne steroide

Pokazano je, da je signalizacija posredstvom ER $\alpha$  neophodna za normalan razvoj timusa kod životinja oba pola (Yellayi i sar., 2000). Kako bi se ispitale potencijalne

fiziološke posledice promena u koncentraciji polnih hormona, koje su pokazane kod ženki pacova tretiranih testosteronom, analizirana je ekspresija ER subtipa  $\alpha$  i AnR u timocitima. U odnosu na kontrolne životinje, u suspenzijama timocita neonatalno androgenizovanih životinja značajno ( $p < 0.01$ ) je smanjen procenat timocita koji ekspimiraju ER $\alpha$ , dok je procenat timocita koji ekspimiraju AnR značajno ( $p < 0.01$ ) povećan. Pored toga, analizom MFI, koji emituje fluorohrom vezan za At, a što odražava gustinu ekspresije molekula (Kamath i sar., 1998), pokazano je da je neonatalna androgenizacija dovela do značajnog ( $p < 0.05$ ) smanjenja gustine ekspresije ER $\alpha$ , dok je gustina ekspresije AnR povećana ( $p < 0.05$ ) (Slika 1).



**Slika 1. Uticaj jednokratnog ubrizgavanja testosterona u kritičnom neonatalnom uzrastu na ekspresiju receptora za polne steroide u timocitima.**

Reprezentativni protočno-fluorocitometrijski prikazi ekspresije (A)  $\alpha$  subtipa receptora za estrogen (ER) i (B) receptora za androgene (AnR), kao i odgovarajuće vrednosti srednjeg intenziteta fluorescence (MFI) koji emituje fluorohrom vezan za antitelo u suspenziji timocita (široka linija) neonatalno androgenizovanih i (tanka linija) kontrolnih ženki pacova. Isprekidanom linijom označena je izotipska kontrola. Stubičasti histogrami predstavljaju (levo) procenat (A) ER $\alpha$ + i (B) AnR+ ćelija, i (desno) promenu MFI za (A) ER $\alpha$  i (B) AnR u suspenziji timocita izolovanih iz neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih ženki pacova (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.1.3. Masa timusa i broj timocita

Kod neonatalno androgenizovanih životinja masa timusa, kao i ukupan broj timocita značajno ( $p < 0.01$ ) su povećani u poređenju sa kontrolnim životinjama (Tabela 2). Pored toga, kod ovih životinja nađeno je značajno ( $p < 0.05$ ) povećanje relativne mase timusa (masa timusa na 100 g telesne mase), kao i relativnog broja timocita (broj timocita na 100 g telesne mase) u poređenju sa kontrolnim životinjama, što ukazuje na to da je tretman testosteronom u kritičnom neonatalnom periodu specifično delovao na timus.

**Tabela 2. Masa timusa, relativna masa timusa, ukupan i relativan broj timocita kod odraslih ženki pacova neonatalno podvrgnutih jednokratnom davanju testosterona (NA) i kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola).**

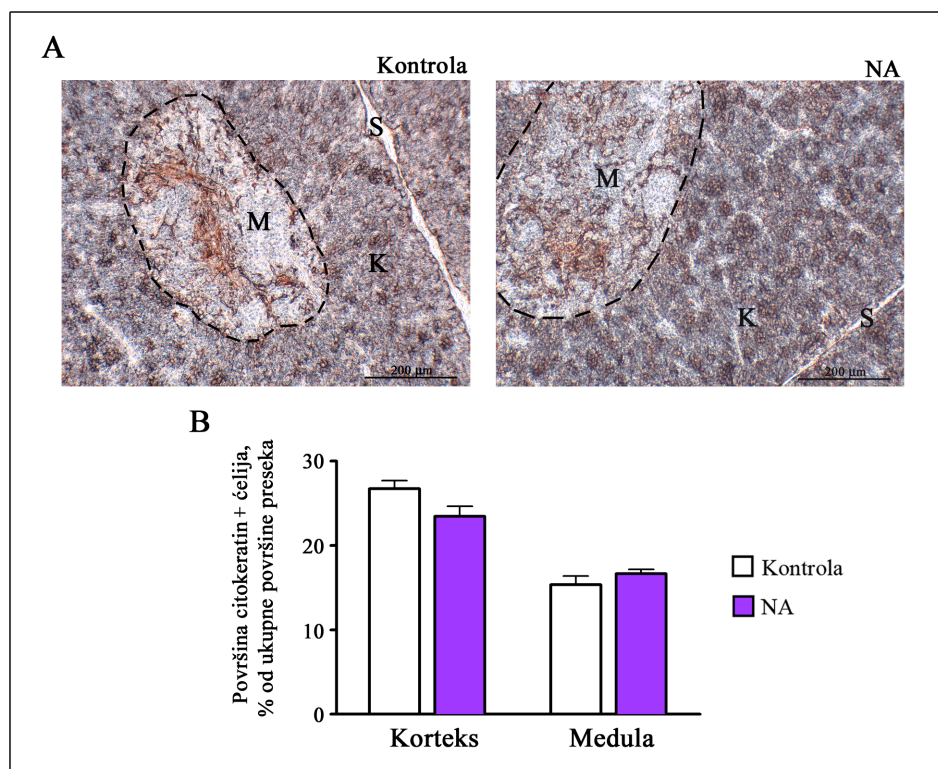
| Grupa                  | Masa timusa (g)   | Relativna masa timusa (g/100 g TM) | Broj timocita ( $\times 10^7$ )/timus | Relativni broj timocita (broj $\times 10^7$ /100 g TM) |
|------------------------|-------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--|
| <b>Kontrola (n=11)</b> | 0.41 $\pm$ 0.02   | 0.28 $\pm$ 0.01                    | 42.0 $\pm$ 1.9                        | 27.7 $\pm$ 1.4   |
| <b>NA (n=6)</b>        | 0.61 $\pm$ 0.03** | 0.32 $\pm$ 0.02*                   | 63.0 $\pm$ 2.9**                      | 34.2 $\pm$ 1.6*  |

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; TM, telesna masa;

#### 4.1.4. Zastupljenost timusnih epitelnih ćelija

TEC predstavljaju najvažniju komponentu strome timusa, koja podleže značajnim promenama tokom ontogeneze. Budući da je za uspostavljanje i održavanje normalne strukture timusa, kao i za odvijanje procesa diferencijacije i sazrevanja timocita neophodna optimalna komunikacija timocita sa ćelijama timusne strome (Kyewski, 1987; Anderson i sar., 1993; van Ewijk i sar., 1994), promene u TEC utiču i na efikasnost timopoeze, a sa druge strane, makar delimično, nastaju kao rezultat promena u samom procesu diferencijacije/sazrevanja timocita. Imajući ovo u vidu analizirana je zastupljenost TEC na presecima timusa, nakon imunohistohemijskog bojenja pan-citokeratinskim At.

Analizom zastupljenosti TEC na presecima timusa, pokazano je da nakon tretmana testosteronom nije došlo do statistički značajne promene gustine TEC kako u korteksu, tako ni u meduli kod neonatalno androgenizovanih životinja u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 2).



**Slika 2. Uticaj neonatalne androgenizacije na zastupljenost timusnih epitelnih ćelija.**

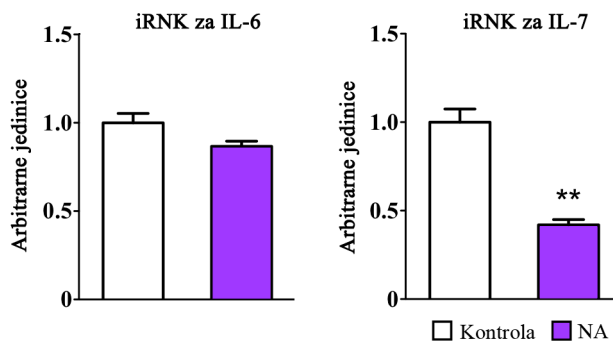
(A) Reprezentativne fotomikrografije preseka timusa neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih životinja (Kontrola) na kojima se uočavaju imunocitohemijski obeležene epitelne ćelije timusa, TEC. Uveličanje x 10. K, korteks; M, medula; S, septa.

(B) Histogram predstavlja površinsku gustinu TEC (% površine citokeratin+ ćelija od ukupne analizirane površine preseka timusa) u spoljašnjem i unutrašnjem korteksu (uključujući i KMZ), kao i u meduli timusa NA i kontrolnih životinja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ).

#### 4.1.5. Ekspresija gena za IL-6 i IL-7

Iako je pokazano da jednokratno ubrizgavanje testosterona u kritičnom neonatalnom uzrastu ne utiče na zastupljenost TEC, još uvek se može postaviti pitanje da li tretman

testosteronom u neonatalnom periodu utiče na sintetski kapacitet ovih ćelija. Kako bi se odgovorilo na ovo pitanje, ispitivana je ekspresija gena za IL-6 i IL-7 u tkivu timusa. Analiza je pokazala da neonatalna androgenizacija nije uticala na ekspresiju gena za IL-6, ali je dovela do značajnog ( $p < 0.01$ ) smanjenja ekspresije gena za IL-7 (Slika 3).



**Slika 3. Uticaj neonatalne androgenizacije na ekspresiju gena za IL-6 i IL-7 u tkivu timusa.**

Histogrami prikazuju relativnu promenu nivoa ekspresije iRNK za IL-6 (levo) i iRNK za IL-7 (desno) u tkivu timusa neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih životinja (Kontrola). Budući da je pokazano, da je ekspresija gena za  $\beta$ -aktin stabilna u tkivu timusa različitih kontrolnih i eksperimentalnih životinja, iRNK za  $\beta$ -aktin korišćena je kao endogena kontrola. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \*\* $p < 0.01$ .

#### **4.1.6. Apoptoza i proliferacija timocita odraslih ženki pacova**

Neonatalni tretman testosteronom imao je za posledicu značajno povećanje ukupnog broja timocita. Kako su proces diferencijacije i sazrevanja timocita praćeni visokom stopom apoptoze i proliferacije, i kako od ova dva procesa u najvećoj meri zavisi celularnost timusa, može se pretpostaviti da je povećanje broja timocita nakon tretmana testosteronom posledica promena u apoptozi i/ili proliferaciji ovih ćelija. Kako bi se potvrdila ova pretpostavka, ispitivana je osetljivost timocita na apoptotske i proliferativne signale.

##### **4.1.6.1. Apoptoza timocita**

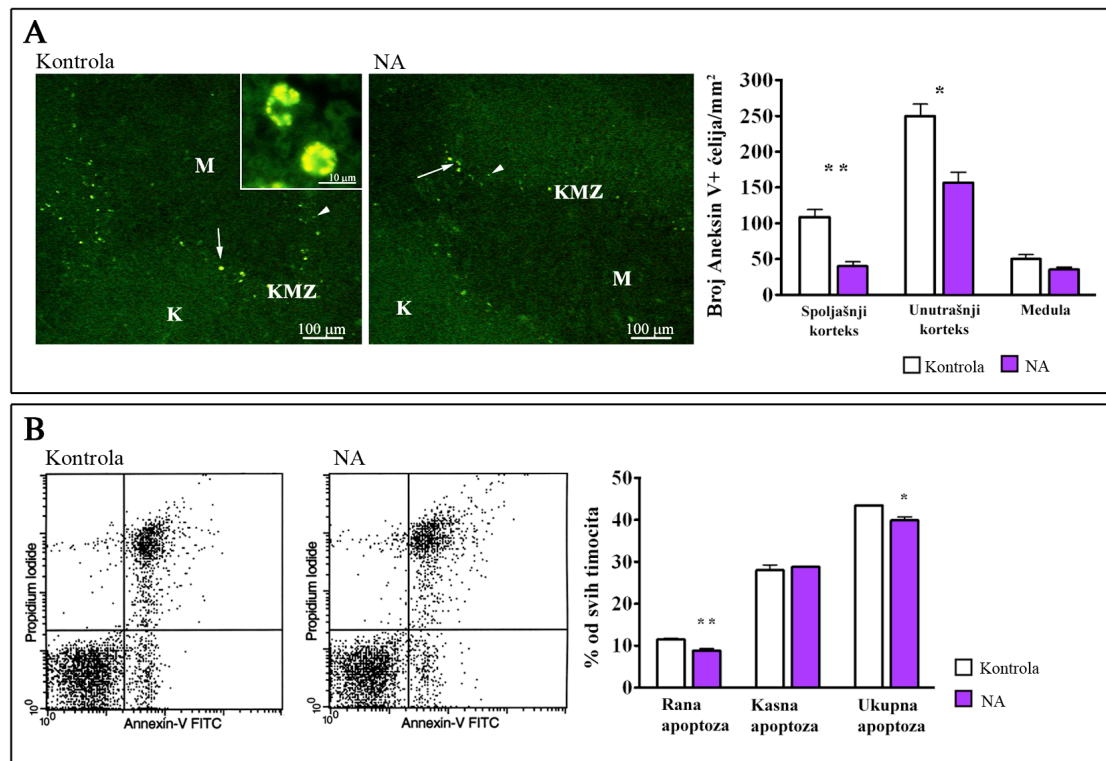
Procenat apoptotičnih ćelija određivan je *in situ*, u timusu, bojenjem timusnih preseka aneksinom V. Budući da na zastupljenost apoptotičnih ćelija na presecima timusa

utiče i fagocitna sposobnost makrofaga (Fadok i sar., 1992), osetljivost timocita na apoptotske signale ispitivana je i *in vitro*, u kulturi timocita korišćenjem aneksin V/PI komercijalnog testa za detekciju apoptotičnih ćelija.

Na timusnim presecima obe grupe životinja ćelije koje su vezale aneksin V obeležen FITC (aneksin V+ ćelije), uočene su uglavnom u predelu KMZ. Aneksin V+ ćelije detektovane su i u spoljašnjem korteksu, a samo retke ćelije su nađene u meduli timusa. Pored timocita koji su pokazivali membransko bojenje aneksin V obeleženim FITC-om, nađene su i ćelije, koje su prema veličini i morfologiji bile slične makrofagama i TNC, koje su pokazivale citoplazmatsko bojenje ovim markerom. Kvantifikacija aneksin V+ ćelija je pokazala da je prosečan broj aneksin V+ ćelija u spoljašnjem ( $p < 0.01$ ) i unutrašnjem ( $p < 0.05$ ) korteksu (uključujući i KMZ) bio značajno manji na presecima timusa neonatalno androgenizovanih životinja u odnosu na preseke timusa kontrolnih životinja (Slika 4).

U suspenziji timocita korišćenjem komercijalnog aneksin V/PI testa za detekciju apoptotičnih ćelija, mogu se izdvojiti tri subpopulacije ćelija: 1) žive ćelije koje ne vezuju ni aneksin V ni PI (AneksinV-/PI-); 2) ćelije u ranoj fazi apoptoze koje vezuju samo aneksin V (AneksinV+/PI-); 3) ćelije u uznapredovaloj fazi apoptoze koje vezuju i aneksin V i PI (AneksinV+/PI+) (Vermes i sar., 1995) (Slika 4).

U saglasnosti sa rezultatima dobijenim *in situ*, u kulturi timocita izolovanih iz neonatalno androgenizovanih životinja ukupan procenat apoptotičnih ćelija je bio značajno ( $p < 0.05$ ) niži nego kod kontrolnih životinja. Smanjenje procenta apoptotičnih ćelija odražavalo je smanjenje učestalosti ćelija u ranoj fazi apoptoze ( $p < 0.01$ ), budući da se procenat ćelija u kasnoj apoptozi nije razlikovao između neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja.



**Slika 4. Uticaj neonatalne androgenizacije na apoptozu timocita.**

(A) Reprezentativne fotomikrografije (levo) preseka timusa obojenih aneksinom V za koji je vezana fluorescentna boja FITC. AneksinV+ timociti (glava strelice) i ćelije nalik na makrofage/timusne ćelije dadilje (TNC) sa citoplazmatskim bojenjem aneksinom V (strelica) uočene su, uglavnom, u kortiko-medularnoj zoni (KMZ) timusa neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih životinja (Kontrola). Uveličanje x10. U umetnutom kvadratu (levo) prikazane su ćelije koje prema veličini i morfologiji liče na makrofage/TNC. Uveličanje x100. Histogram (desno) predstavlja gustinu apoptotičnih ćelija (broj aneksin V+ ćelija/mm<sup>2</sup> preseka timusa) u spoljašnjem i unutrašnjem korteksu (uključujući i KMZ), kao i u meduli timusa NA i kontrolnih životinja. K, korteks; M, medula;

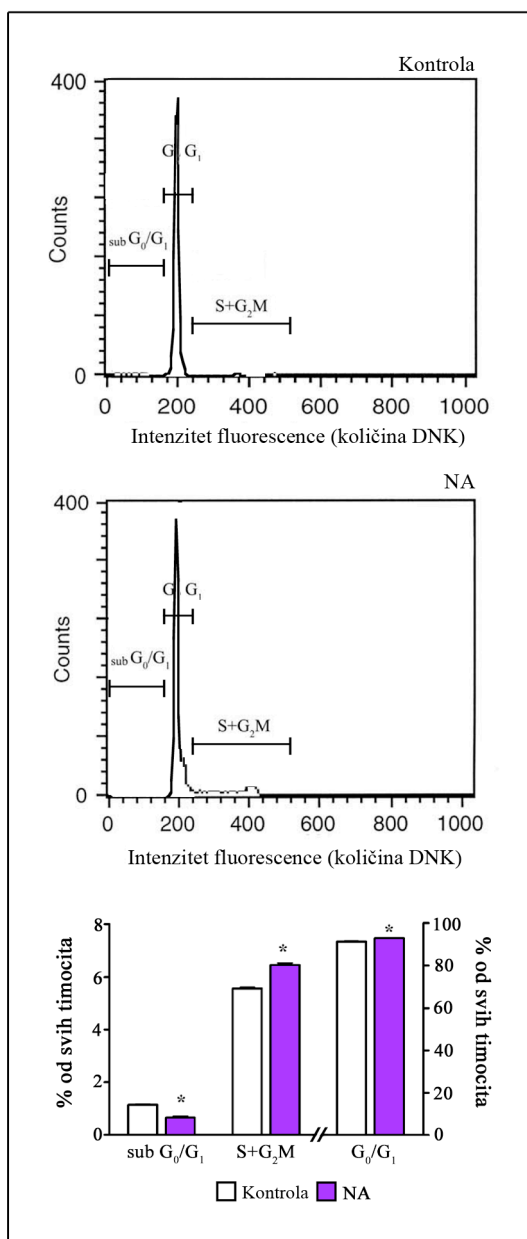
(B) Reprezentativni tačkasti fluorocitometrijski profili (levo) vezivanja aneksina V/PI u kulturi timocita NA i kontrolnih životinja. Na osnovu vezivanja aneksina V/PI razdvojene su: žive ćelije (aneksin V-/PI-); ćelije u ranoj fazi apoptoze (aneksin V+/PI-), kao i ćelije u uznapredovaloj/kasnoj apoptozu (aneksin V+/PI+). Terminom ukupna apoptoza označen je procenat ćelija u ranoj (aneksinV+/PI-) i uznapredovaloj/kasnoj (aneksinV+/PI+) apoptozu. Histogram (desno) predstavlja procenat ćelija u ranoj i kasnoj fazi apoptoze kao i ukupan procenat apoptotičnih ćelija u 18-časovnoj kulturi timocita izolovanih iz NA i kontrolnih životinja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



#### 4.1.6.2. Proliferacija timocita

Uticaj jednokratnog davanja testosterona na procenat ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa određivan je merenjem količine ćelijske DNK u suspenzijama sveže izolovanih timocita, korišćenjem PI. Nakon permeabilizacije ćelije, PI se stehiometrijski vezuje za DNK i omogućava razdvajanje: 1) ćelija koje imaju niži intenzitet fluorescence-maniji sadržaj DNK i odgovaraju apoptotičnim ćelijama (subG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>); 2) ćelija sa normalnim sadržajem DNK, koje odgovaraju ćelijama u fazi mirovanja, odnosno ćelijama koje se pripremaju za ćelijsku deobu (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>); 3) ćelija sa povećanim sadržajem DNK (S+G<sub>2</sub>M), odnosno ćelije u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa koje obuhvataju : ćelije koje udvajaju DNK (S), ćelija sa udvostručenim sadržajem DNK (G<sub>2</sub>), kao i ćelija u procesu ćelijske deobe (M). Analizom ugradnje PI u suspenzijama sveže izolovanih timocita, pokazano je značajno (p<0.05) smanjenje procenta apoptotičnih i povećanje (p<0.05) procenta živih kao i procenta ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa u timocitnim suspenzijama izolovanim iz neonatalno androgenizovanih u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 5).

Osetljivost timocita na proliferativne signale ispitivana je u *in vitro* uslovima, u odsustvu i u prisustvu mitogena (ConA), određivanjem procenta ćelija koje su ugradile nukleotidni analog BrdU. U kulturi timocita određivan je ukupan procenat BrdU+ ćelija, kao i procenat BrdU+ ćelija u subpopulacijama timocita koje su razdvajane na osnovu ekspresije CD3 molekula. Na osnovu ekspresije CD3 molekula u suspenzijama timocita mogu se razdvojiti ćelije koje ispoljavaju visok (CD3<sup>++</sup>), nizak (CD3<sup>+</sup>) i nedetektabilan nivo ovog molekula (CD3<sup>-</sup>) (Slika 6).



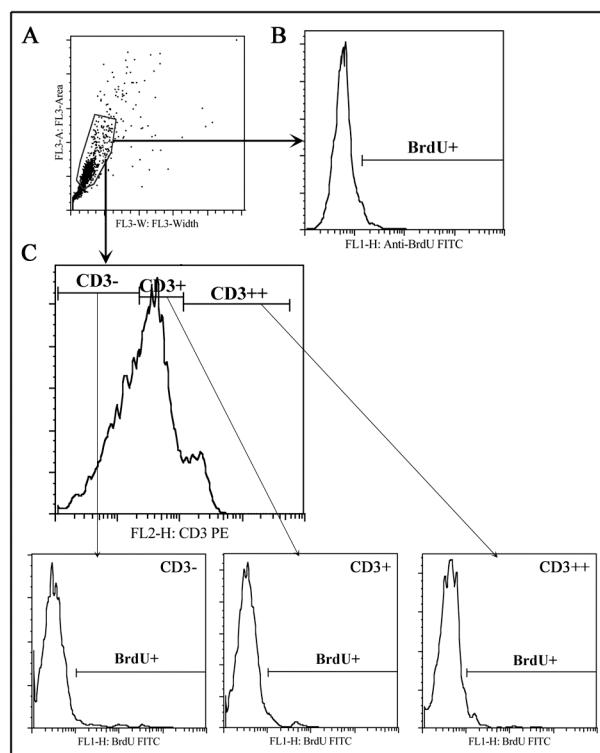
### Slika 5. Uticaj neonatalne

### androgenizacije na proliferaciju timocita.

Reprezentativni protočno-fluorocitometrijski histogrami prikazuju timocite u različitim fazama ćelijskog ciklusa, koji se mogu razlikovati na osnovu ugradnje PI kod neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih životinja (Kontrola). Na osnovu količine vezanog PI razdvojene su: 1) ćelije koje emituju fluorescencu nižeg intenziteta-imaju niži sadržaj DNK i odgovaraju apoptotičnim ćelijama (sub $G_0/G_1$ ); 2) ćelije sa normalnim sadržajem DNK, koje odgovaraju ćelijama u fazi mirovanja, odnosno ćelijama koje se pripremaju za ćelijsku deobu ( $G_0/G_1$ ); 3) ćelije sa povećanim sadržajem DNK (S+ $G_2$ M), odnosno ćelije u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa koje obuhvataju: ćelije koje udvajaju DNK (S), ćelije sa udvostručenim sadržajem DNK ( $G_2$ ), kao i ćelije u procesu ćelijske deobe (M).

Histogrami predstavljaju procenat ćelija u Sub $G_0/G_1$ ,  $G_0/G_1$  i S+ $G_2$ M fazama ćelijskog ciklusa, u suspenzijama sveže izolovanih timocita NA i kontrolnih životinja.

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



**Slika 6. Protočno-fluorocitometrijski profili analize proliferacije timocita na osnovu ugradnje nukleotidnog analoga BrdU.**

Procenat BrdU+ ćelija u celokupnoj populaciji timocita i u okviru subpopulacija timocita razdvojenih na osnovu ekspresije CD3 molekula.

(A) Žive ćelije izdvajane su upotrebom modula za razdvajanje dubleta (engl. doublet discriminating module, DDM), kao što je prikazano na tačkastom fluorocitometrijskom profilu.

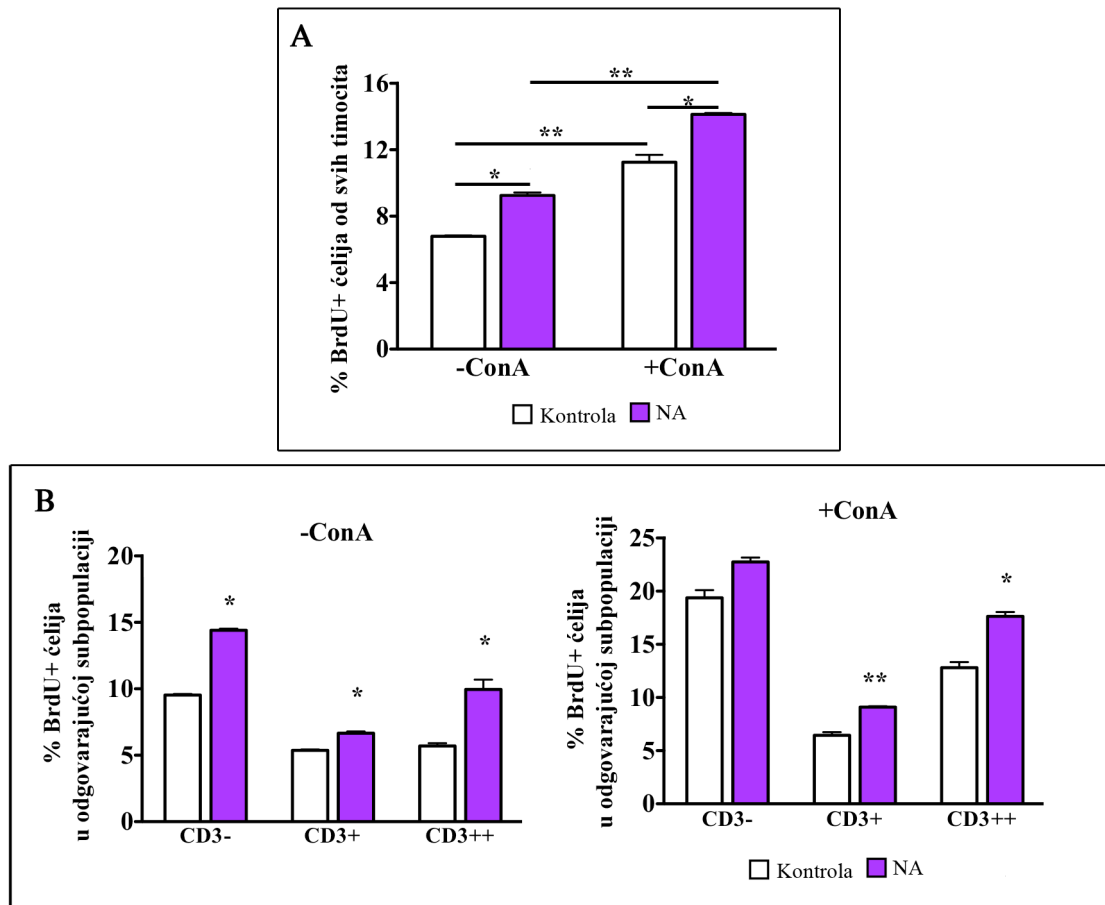
(B) U populaciji živih ćelija određivan je procenat ćelija koje su ugradile BrdU kao što je prikazano na fluorocitometrijskom histogramu.

(C) U populaciji živih ćelija izdvajane su subpopulacije timocita koje ispoljavaju visok (CD3++), nizak (CD3+) i nedetektabilan nivo ekspresije CD3 molekula (CD3-) kao što je prikazano na fluorocitometrijskom histogramu, a procenat ćelija koje su ugradile BrdU određivan je u svakoj subpopulaciji.

Pokazano je, da je u kulturi timocita neonatalno androgenizovanih životinja procenat ćelija koje su ugradile BrdU (BrdU+ ćelije) bio značajno ( $p < 0.05$ ) viši nego kod kontrolnih životinja istog uzrasta (Slika 7). U prisustvu mitogena (ConA), došlo je do značajnog ( $p < 0.01$ ) povećanja procenta BrdU+ ćelija u kulturama timocita obe grupe životinja u poređenju sa odgovarajućim kulturama bez mitogena, ali je procenat BrdU+

ćelija bio značajno ( $p < 0.05$ ) viši u kulturi timocita neonatalno androgenizovanih životinja u poređenju sa kontrolnim životinjama.

U odsustvu ConA, procenat BrdU+ ćelija bio je značajno ( $p < 0.05$ ) viši u svim analiziranim subpopulacijama timocita (CD3-, CD3+ i CD3++) koje su izolovane iz neonatalno androgenizovanih životinja u odnosu na odgovarajuće subpopulacije timocita izolovanih iz kontrolnih životinja. Međutim, u prisustvu ConA, u kulturama timocita izolovanih iz neonatalno androgenizovanih životinja nađen je značajno veći procenat BrdU+ ćelija u subpopulacijama ćelija koje ispoljavaju nizak ( $p < 0.01$ ) i visok ( $p < 0.05$ ) nivo ekspresije CD3 molekula u poređenju sa procentom ćelija u odgovarajućim subpopulacijama timocita izolovanim iz kontrolnih životinja (Slika 7).



**Slika 7. Uticaj neonatalne androgenizacije na proliferaciju timocita u kulturi.**

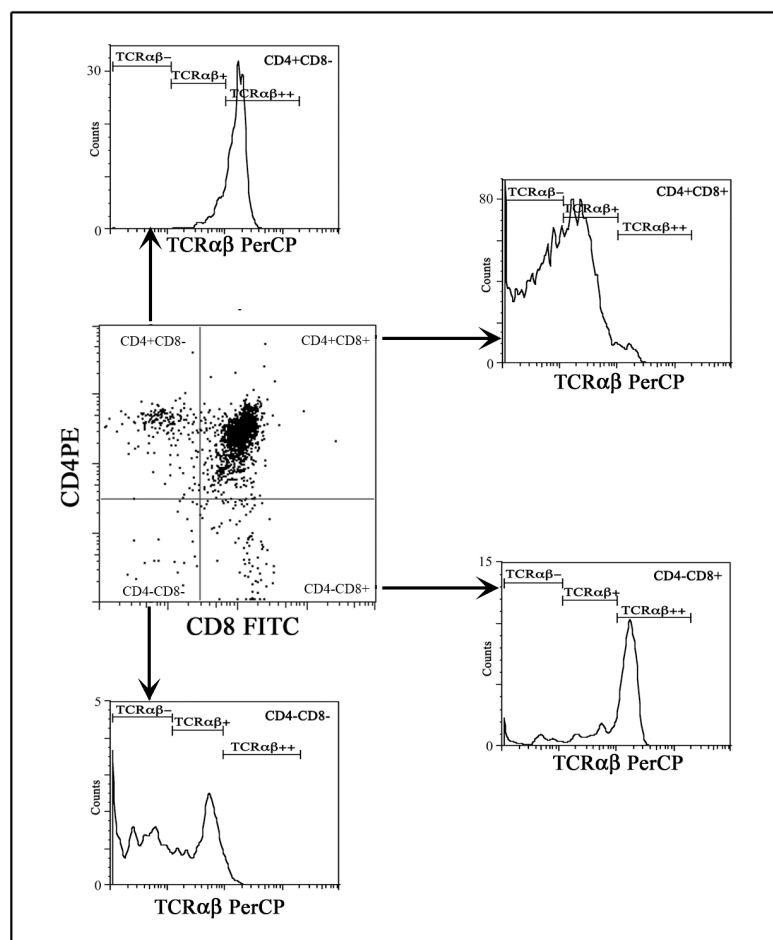
(A) Histogram predstavlja procenat BrdU+ ćelija u suspenziji timocita, nakon 48-časovne kultivacije, u odsustvu (-ConA) i prisustvu ConA (+ConA) kod neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih životinja (Kontrola).

(B) Histogrami predstavljaju procenat BrdU+ ćelija u subpopulacijama timocita razdvojenih na osnovu gustine ekspresije CD3 na CD3-, CD3+ i CD3++ u suspenziji timocita NA i kontrolnih životinja, nakon 48-časovne kultivacije u odsustvu (-ConA) i prisustvu ConA (+ConA). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

#### **4.1.7. Uticaj neonatalne androgenizacije na fenotipske karakteristike timocita**

##### **4.1.7.1. Ekspresija CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$**

Kako bi se utvrdilo da li jednokratno ubrizgavanje testosterona u kritičnom neonatalnom uzrastu dovodi do promena u diferencijaciji/sazrevanju timocita, određivana je procentualna zastupljenost, kao i broj timocita na različitim stadijumima diferencijacije/sazrevanja. Na osnovu ekspresije CD4 i CD8 koreceptorskih molekula mogu se razlikovati četiri različite populacije timocita: CD4-CD8- (DN), CD4+CD8+ (DP), CD4+CD8- (CD4+JP) i CD4-CD8+ (CD8+JP). U okviru svake od ovih populacija, na osnovu gustine ekspresije TCR $\alpha\beta$ , mogu se izdvojiti ćelije sa nedetektabilnom ekspresijom TCR $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta$ -), odnosno ćelije koje ispoljavaju nizak (TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>) i ćelije koje ispoljavaju visok nivo membranske ekspresije TCR $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup>) (Slika 8).



**Slika 8. Prikaz protočno-fluorocitometrijske analize trokolornog bojenja timocitne suspenzije fluorohromima obeleženim monoklonskim antitelima specifičnim za CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$ .**

Četiri populacije timocita izdvojene su na osnovu ekspresije CD4 i CD8 koreceptorskih molekula, kao što je prikazano na tačkastom protočno-fluorocitometrijskom profilu. Unutar svake od ovih populacija timocita, na osnovu gustine površinske ekspresije TCR $\alpha\beta$ , mogu se razlikovati ćelije koje ne ispoljavaju detektabilan nivo ekspresije TCR $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta$ -), odnosno ćelije koje ispoljavaju nizak (TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>) i visok (TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup>) nivo ekspresije TCR $\alpha\beta$ , kao što je prikazano na protočno-fluorocitometrijskim histogramima.

### **CD4-CD8-**

Jednokratno ubrizgavanje testosterona u neonatalnom uzrastu imalo je za posledicu značajno ( $p < 0.05$ ) smanjenje procenta najnezrelijih CD4-CD8-(DN) TCR $\alpha\beta$ - ćelija, kao i značajno ( $p < 0.05$ ) smanjenje procenta DN TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> timocita, koji fenotipski odgovaraju ćelijama koje ulaze u apoptozu (Budd i Mixter, 1995). Pored toga, ovaj tretman je doveo do

značajnog ( $p < 0.01$ ) povećanja procenta DN timocita koji ispoljavaju visok nivo  $TCR\alpha\beta$  ( $TCR\alpha\beta^{++}$ ) u poređenju sa kontrolnim životinjama. Kod miša, ovoj populaciji timocita pripadaju: 1) ćelije koje ispoljavaju receptor NK ćelija (CD161) i 2) potencijalno autoreaktivne ćelije (Budd i Mixer, 1995). Međutim, kako je pokazano da kod pacova najveći broj  $TCR\alpha\beta^{++}$  timocita koji ispoljavaju CD161, ispoljavaju i CD8 koreceptorni molekul (Matsuura i sar., 2000), malo je verovatno da je porast učestalosti NKT ćelija doprineo porastu učestalosti DN  $TCR\alpha\beta^{++}$  timocita. Tretman testosteronom nije uticao na ukupan broj DN  $TCR\alpha\beta^{-}$  timocita, ali je doveo do smanjenja ( $p < 0.05$ ) ukupnog broja DN  $TCR\alpha\beta^{+}$  timocita i povećanja ( $p < 0.01$ ) ukupnog broja DN  $TCR\alpha\beta^{++}$  timocita (Slika 9).

### ***CD4+CD8+***

Kod neonatalno androgenizovanih životinja došlo je do značajnog ( $p < 0.05$ ) smanjenja procenta  $CD4+CD8+(DP)$  timocita koji su „prošli“  $\beta$ -selekciju i započinju rearanžman  $TCR\alpha$  genskog lokusa, DP  $TCR\alpha\beta^{-}$  timociti (Zamoyska i Lovatt, 2004). Neonatalni tretman testosteronom nije uticao na procenat ćelija za koje se smatra da predstavljaju ćelije koje ulaze u pozitivnu selekciju (DP  $TCR\alpha\beta^{+}$ ) (Zamoyska i Lovatt, 2004), ali je doveo do značajnog ( $p < 0.01$ ) povećanja procenta ćelija koje su upravo „prošle“ pozitivnu selekciju, odnosno DP  $TCR\alpha\beta^{++}$  ćelija (Shortman i sar., 1991; Zamoyska i Lovatt, 2004). Pored toga, tretman testosteronom nije uticao na ukupan broj DP  $TCR\alpha\beta^{-}$  i DP  $TCR\alpha\beta^{+}$  ćelija, ali je doveo je do značajnog ( $p < 0.01$ ) povećanja brojnosti pozitivno selektovanih, DP  $TCR\alpha\beta^{++}$  timocita (Slika 9).

### ***CD4+CD8-***

U populaciji  $CD4+CD8-(CD4+JP)$  timocita tretman testosteronom uticao je samo na procentualnu zastupljenost najzrelijih timocita, koji ispoljavaju visok nivo  $TCR\alpha\beta$  ( $CD4+JP TCR\alpha\beta^{++}$ ), dovodeći do značajnog ( $p < 0.05$ ) smanjenja procenta ovih ćelija, dok je procenat ostalih subpopulacija  $CD4+JP$  ( $TCR\alpha\beta^{-}$  i  $TCR\alpha\beta^{+}$ ) ostao

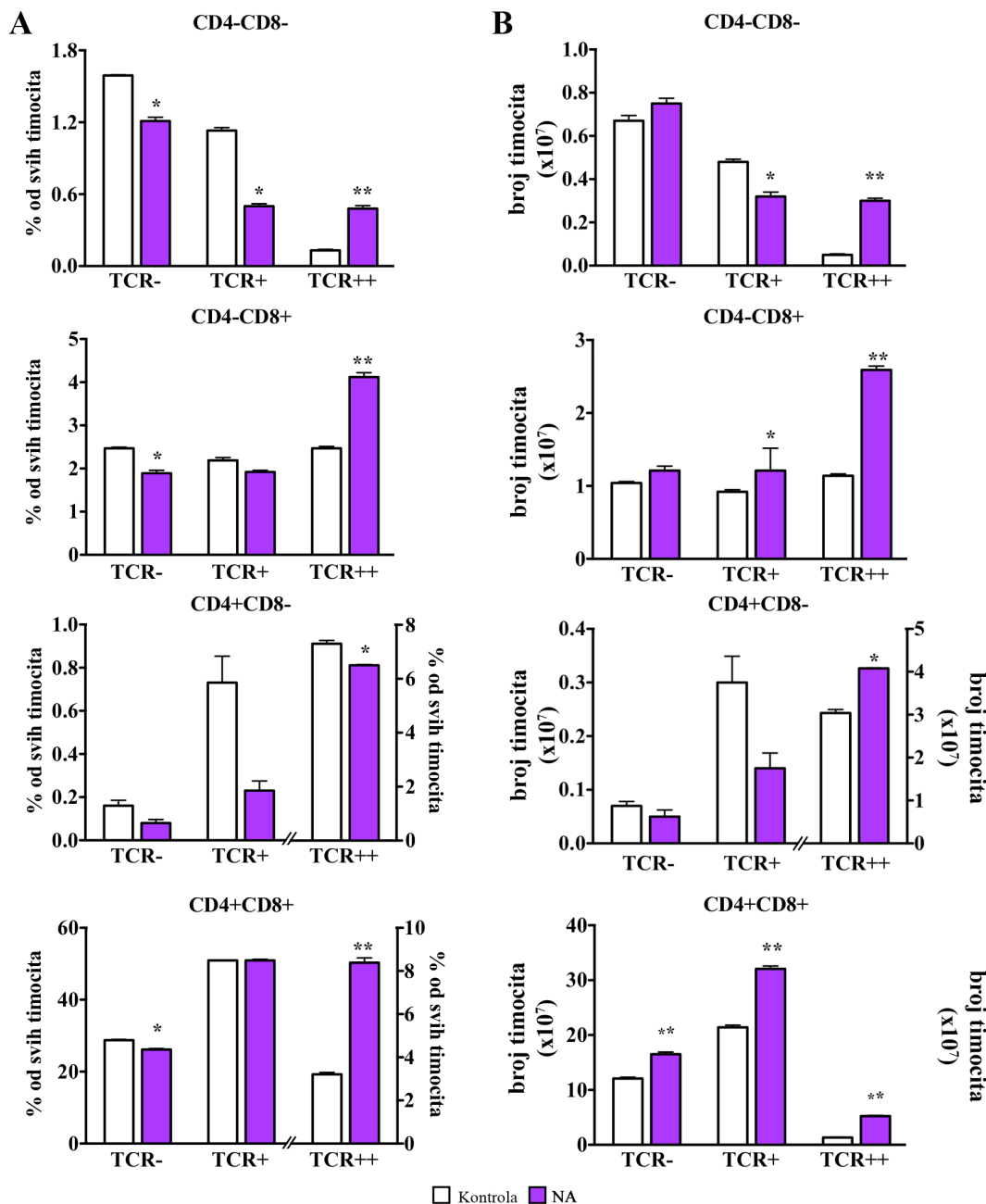


nepromenjen. Tretman testosteronom je imao suprotan efekat na brojnost CD4+JP TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita, dovodeći do povećanja ( $p<0.05$ ) njihovog ukupnog broja, ali nije delovao na brojnost ostalih subpopulacija CD4+JP (TCR $\alpha\beta^-$  i TCR $\alpha\beta^+$ ) (Slika 9).

### **CD4-CD8+**

Tretman testosteronom u kritičnom neonatalnom uzrastu doveo je do smanjenja ( $p<0.05$ ) procenta najnezrelijih CD4-CD8+ (CD8+JP) TCR $\alpha\beta^-$  timocita, nije uticao na procenat CD8+JP TCR $\alpha\beta^+$  timocita, ali je doveo do značajnog ( $p<0.01$ ) povećanja procenta najzrelijih CD8+JP TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita. Ukupan broj nejnezrelijih CD8+JP TCR $\alpha\beta^-$  timocita, ostao je nepromenjen u timusu neonatalno androgenizovanih životinja, dok je ukupan broj CD8+JP TCR $\alpha\beta^+$  ( $p<0.05$ ) i CD8+JP TCR $\alpha\beta^{++}$  ( $p<0.01$ ) timocita značajno povećan u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 9).

Kao posledica nesrazmernog povećanja brojnosti najzrelijih CD4+JP TCR $\alpha\beta^{++}$  i CD8+JP TCR $\alpha\beta^{++}$  subpopulacija timocita, odnos njihove procentualne zastupljenosti (CD4+JP TCR $\alpha\beta^{++}$  : CD8+JP TCR $\alpha\beta^{++}$ ) je značajno ( $p<0.01$ ) smanjen kod neonatalno androgenizovanih životinja u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 19).

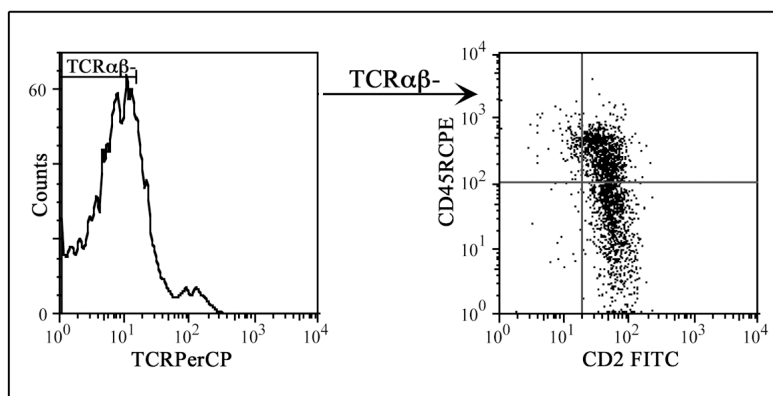


**Slika 9.** Uticaj neonatalne androgenizacije na procenat i ukupan broj timocita u različitim stadijima diferencijacije/sazrevanja koji su razdvojeni na osnovu ekspresije CD4/CD8/TCR $\alpha\beta$  markera. Histogrami predstavljaju (A) procenat i (B) ukupan broj ćelija sa različitim nivoom ekspresije TCR $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta$ - nedetektabilna; TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, niska i TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup>, visoka ekspresija TCR $\alpha\beta$ ) u okviru populacija timocita razdvojenih na osnovu ekspresije CD4 i CD8 molekula (CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+) kod neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih životinja (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. (n $\geq$ 6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

#### 4.1.7.2. Ekspresija TCR $\alpha\beta$ , CD2 i CD45RC molekula na CD4-CD8- timocitima

Imajući u vidu da je jednokratno ubrizgavanje testosterona u neonatalnom uzrastu dovelo do promene procentualne zastupljenosti najnezrelijih DN TCR $\alpha\beta$ - timocita, sa jedne strane, kao i podatke koji ukazuju na to da je, kod miša, ova subpopulacija timocita naročito osetljiva na delovanje estradiola (Zoller i Kersh, 2006; Wang i sar., 2008) sa druge strane, detaljnijom fenotipskom karakterizacijom ove subpopulacije učinjen je pokušaj da se identifikuju moguće promene na najranijim stadijumima razvoja timocita.

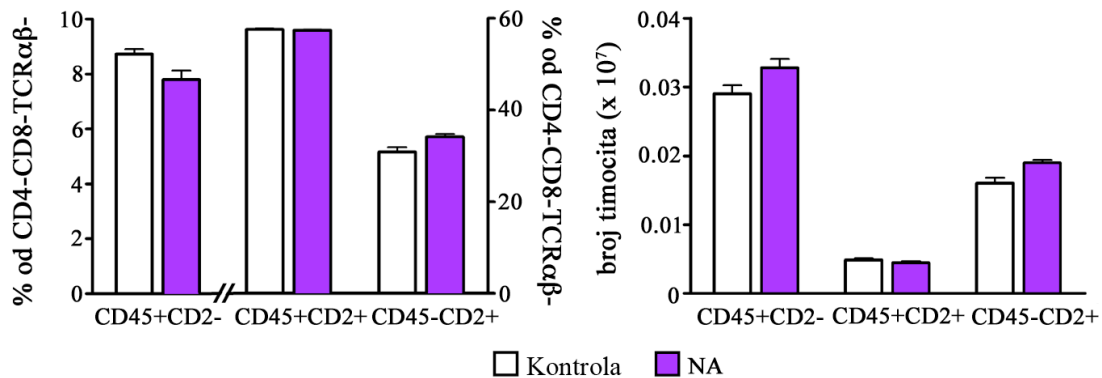
Kod pacova, za razliku od miša i čoveka, rani stadijumi diferencijacije timocita mogu se pratiti na osnovu sekvencijalne pojave CD45RC i CD2 molekula: CD45RC+CD2, CD45RC+CD2+ i CD45RC-CD2+ (Law i sar., 1989; Hünig i sar., 2001).



**Slika 10. Protočno-fluorocitometrijska analiza trokolornog bojenja populacije timocita CD4-CD8- fenotipa fluorohromima obeleženim antitelima specifičnim za CD2, CD45RC i TCR $\alpha\beta$ .**

Timociti CD4-CD8- (DN) fenotipa su izolovani primenom metode magnetnog razdvajanja, korišćenjem antitela protiv CD4 i CD8 molekula koja su vezana za magnetne čestice. Izdvojeni DN timociti su nakon toga inkubirani sa fluorohromima obeleženim monoklonskim antitelima protiv CD2, CD45RC i TCR $\alpha\beta$  molekula. Na histogramu je predstavljen citofluorimetrijski profil ekspresije TCR $\alpha\beta$  molekula u populaciji DN timocita (levo) i način izdvajanja subpopulacije trostruko negativnih CD4-CD8- TCR $\alpha\beta$ - timocita koje su dalje analizirane na osnovu ekspresije CD2 i CD45RC molekula, kao što je prikazano na tačkastom protočno-citofluorimetrijskom profilu (desno).

Tretman testosteronom nije doveo do statistički značajnih promena u zastupljenosti pojedinih subpopulacija DN TCR $\alpha\beta$ - timocita, razdvojenih na osnovu ekspresije CD2 i CD45RC molekula, kao ni do promena njihove celularnosti (Slika 11).



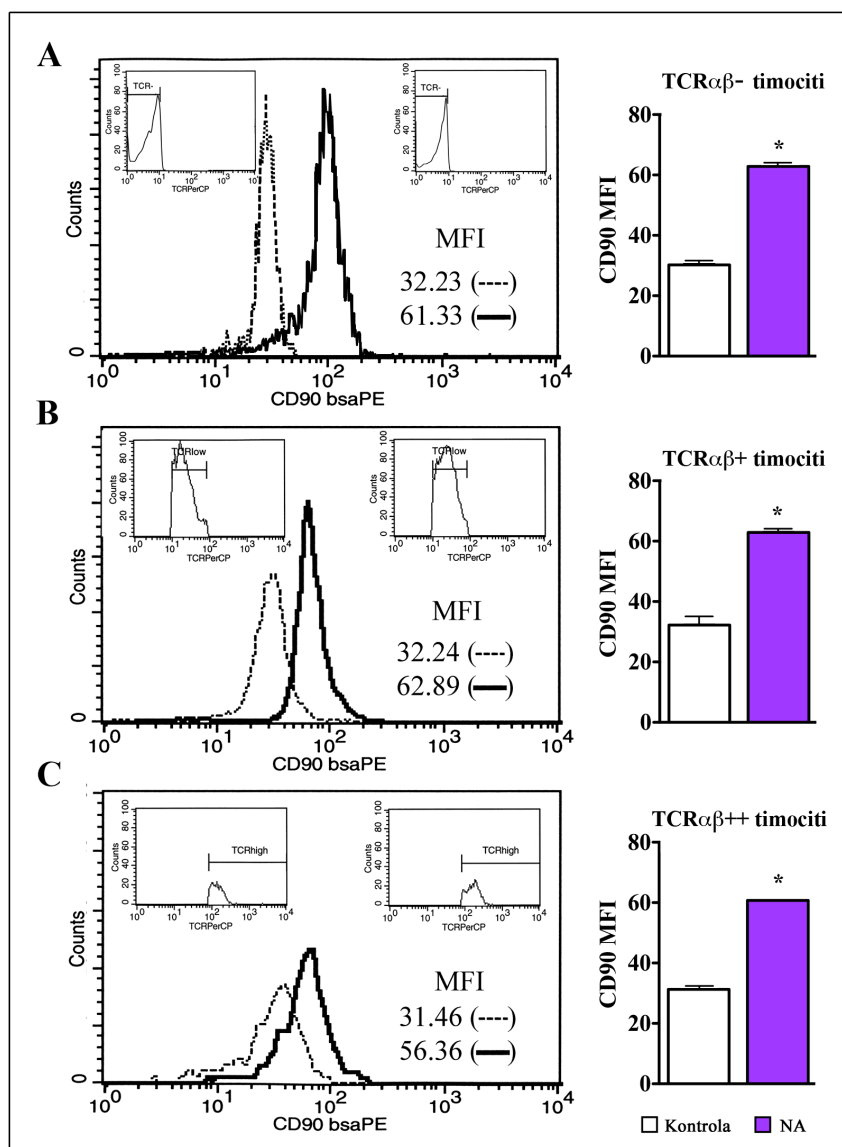
**Slika 11. Jednokratno ubrizgavanje testosterona u kritičnom neonatalnom uzrastu nije uticalo na procenat i ukupan broj ćelija u subpopulacijama CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - timocita razdvojenih na osnovu ekspresije CD2 i CD45RC molekula.**

Histogrami predstavljaju (levo) procenat i (desno) ukupan broj CD45RC+CD2-, CD45RC+CD2+ i CD45RC-CD2+ timocita u populaciji CD4-CD8- TCR $\alpha\beta$ - timocita neonatalno androgenizovanih (NA) životinja i kontrolnih životinja (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ).

#### 4.1.7.3. Ekspresija CD90

Pošto je pokazano, da je neonatalna androgenizacija dovela do značajnog povećanja procenta DP TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita, za koje se smatra da predstavljaju ćelije koje su „prošle“ pozitivnu selekciju (Shortman i sar., 1991), a imajući u vidu podatke koji ukazuju na to da CD90 (Thy-1) molekul reguliše intenzitet signala koji se prenosi posredstvom TCR $\alpha\beta$  i sledstveno „praga“ za selekciju timocita (Hueber i sar., 1997), analizirali smo ekspresiju ovog molekula na timocitima. Analizom ekspresije CD90 molekula u suspenziji timocita, pokazano je da se procenat CD90+ ćelija nije značajno razlikovao između neonatalno androgenizovanih ( $99.35 \% \pm 0.01 \%$ ) i kontrolnih životinja ( $99.69 \% \pm 0.03 \%$ ). Međutim, analizom MFI za CD90 na CD90+ timocitima pokazano je da je tretman testosteronom

doveo do značajnog ( $p < 0.05$ ) povećanja gustine ekspresije ovog molekula na timocitima. Srednja vrednost MFI za CD90, analizirana na svim timocitima, bila je približno 98% veća kod neonatalno androgenizovanih ( $61.32 \pm 0.16$ ) nego kod kontrolnih životinja ( $31.02 \pm 0.06$ ), što je od posebnog značaja budući da je pokazano da povećanje MFI od dva puta odgovara dvostrukom povećanju površinske gustine antigena (Kamath i sar., 1998). Analiza ekspresije CD90 na TCR $\alpha\beta$ - timocitima, koju uglavnom sačinjavaju kortikalni DP timociti, koji su „prošli“  $\beta$ -selekciju i započinju rearanžman TCR $\alpha$  genskog lokusa, pokazala je da je srednja vrednost MFI za CD90 bila skoro dvostruko povećana ( $p < 0.05$ ) kod neonatalno androgenizovanih, u poređenju sa kontrolnim životinjama. Slično povećanje ( $p < 0.05$ ) MFI vrednosti CD90 pokazano je i na TCR $\alpha\beta^+$  timocitima, koje uglavnom sačinjavaju kortikalni DP timociti, koji ulaze u selekzione procese. Pored toga, kod neonatalno androgenizovanih životinja pokazano je značajno ( $p < 0.05$ ) povećanje (skoro dvostruko) MFI vrednosti za CD90 i na TCR $\alpha\beta^{++}$  timocitima, koje uglavnom predstavljaju medularni, DP timociti, koji su „prošli“ pozitivnu selekciju, kao i zrele JP ćelije, u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 12).

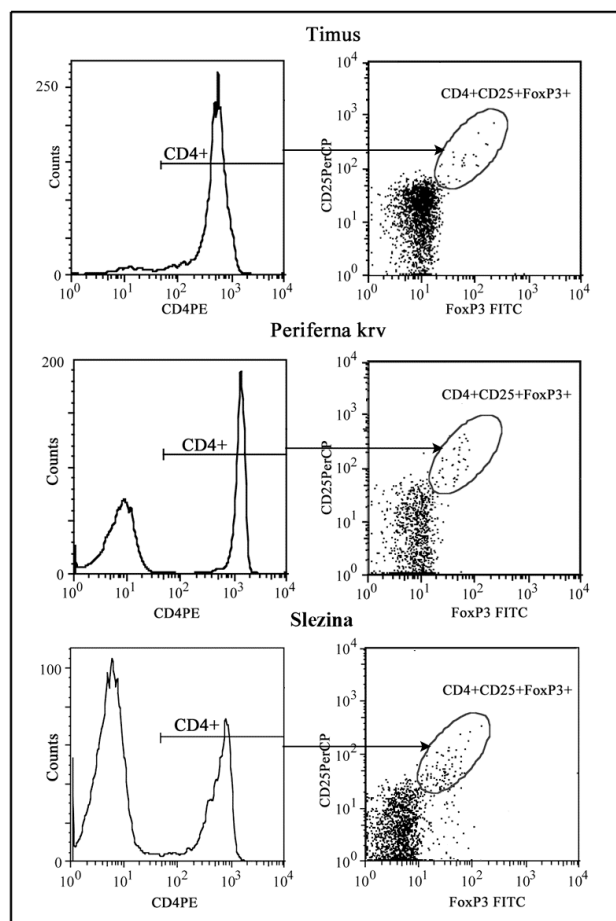


**Slika 12. Uticaj neonatalne androgenizacije na ekspresiju CD90 molekula na timocitima.**

Protočno-fluorocitometrijski profili prikazuju ekspresiju CD90 molekula kao i odgovarajuće vrednosti srednjeg intenziteta fluorescence (MFI) koji emituje fluorohrom vezan za antitelo specifično za CD90 u populacijama timocita koji ispoljavaju (A) nedetektabilan nivo ekspresije TCR $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta^-$ ), (B) nizak TCR $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta^+$ ) i (C) visok TCR $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta^{++}$ ) izolovanih iz (široka linija) neonatalno androgenizovanih (NA) i (tanka linija) kontrolnih životinja (Kontrola). Razdvajanje timocita na osnovu ekspresije TCR $\alpha\beta$  učinjeno je, kao što je prikazano u umetnutim histogramima u levom (Kontrola) i desnom uglu (NA). Stubičasti histogrami predstavljaju MFI vrednosti za populaciju (A) TCR $\alpha\beta^-$ , (B) TCR $\alpha\beta^+$  i (C) TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita izolovanih iz NA i Kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \* $p < 0.05$ .

#### 4.1.7.4. Čelije CD4+CD25+FoxP3+ fenotipa

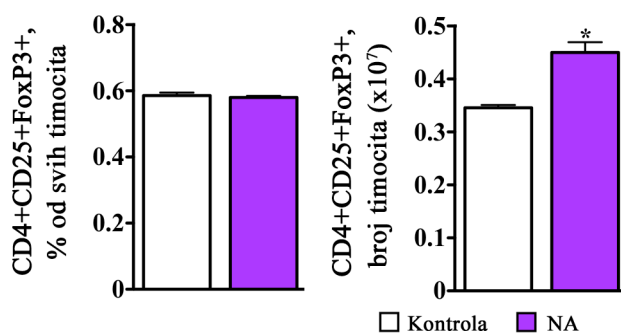
Budući da u timusu pored konvencionalnih sazrevaju i regulatorne ćelije, za koje je pokazano da imaju važnu ulogu na periferiji, gde suprimiraju patološki imunski odgovor na sopstvene antigene i razvoj autoimunosti (Seddon i Mason, 2000; Hori i sar., 2003; Sakaguchi, 2004; Maggi i sar., 2005), u suspenzijama timocita smo određivali zastupljenost ćelija sa fenotipom regulatornih ćelija, CD4+CD25+FoxP3+ (Slika 13).



**Slika 13. Prikaz protočno-fluorocitometrijske analize trokolornog bojenja suspenzije timocita, limfocita periferne krvi i slezine fluorohromima obeleženim antitelima protiv CD4, CD25 i FoxP3.**

Protočno-fluorocitometrijski profili izdvajanja ćelija CD4+CD25+FoxP3+ fenotipa u suspenziji timocita, limfocita periferne krvi i slezine. Populacija CD4+ ćelija je izdvajana kao što je prikazano na protočno-fluorocitometrijskom histogramima (levo), a potom su ćelije koje ispoljavaju CD25+ i FoxP3+ izdvajane kao što je pokazano na tačkastom protočno-fluorocitometrijskom profilu (desno).

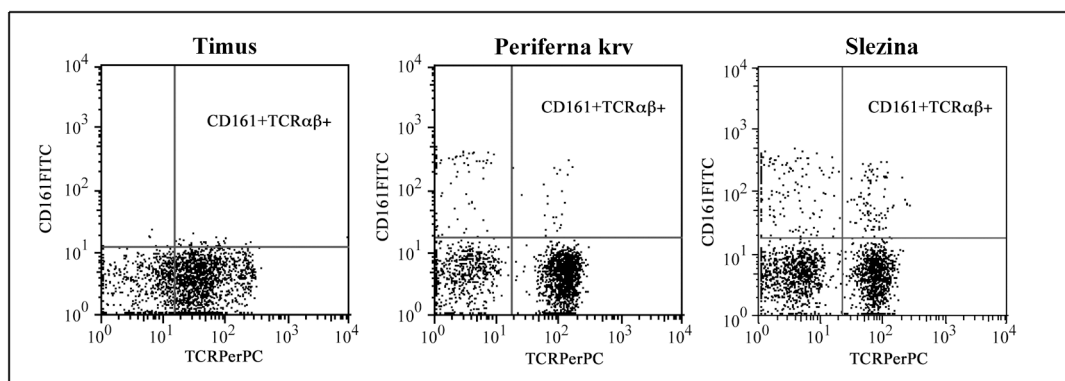
Tretman testosteronom u kritičnom neonatalnom periodu nije uticao na procenat timocita sa CD4+CD25+FoxP3+ fenotipom, ali je doveo do značajnog ( $p < 0.05$ ) povećanja broja ovih ćelija u timusu neonatalno androgenizovanih u odnosu na kontrolne životinje (Slika 14).



**Slika 14. Uticaj neonatalne androgenizacije na procenat i ukupan broj CD4+CD25+FoxP3+ timocita.** Stubičasti histogrami predstavljaju (levo) procenat i (desno) ukupan broj CD4+CD25+FoxP3+ ćelija u timusu neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih ženki pacova (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \* $p < 0.05$ .

#### 4.1.7.5. Ćelije CD161+TCR $\alpha\beta$ + fenotipa

Budući da u timusu sazreva još jedna populacija T-ćelija sa imunoregulatornom ulogom, NKT ćelije, koje ekspimiraju NKR-P1A (CD161) molekul, karakterističan za NK ćelije i TCR $\alpha\beta$  (Godfrey i sar., 2000; Crowe i sar., 2005) u timocitnim suspenzijama određivana je procentualna zastupljenost i broj CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija (Slika 15).

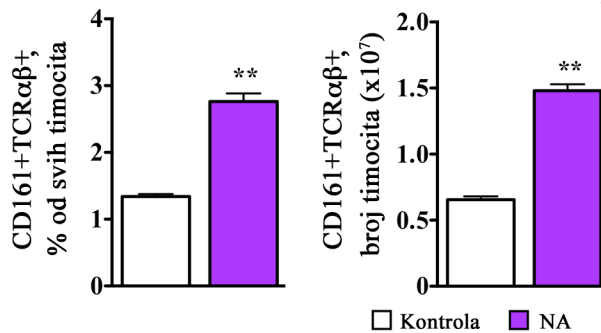


**Slika 15. Protočno-fluorocitometrijska analiza dvokolnog bojenja timocitne suspenzije fluorohromima obeleženim antelima protiv CD161 (NKR-P1A) i TCR $\alpha\beta$  molekula.**

Populacija CD161+TCR $\alpha\beta$ + timocita, limfocita periferne krvi i splenocita je izdvajana na osnovu ekspresije CD161(NKR-P1A) i TCR $\alpha\beta$ , kao što je pokazano na tačkastom protočno-fluorocitometrijskom profilu.



Neonatalna androgenizacija dovela je do značajnog ( $p < 0.01$ ) povećanja procenta i ukupnog broja NKT ćelija ( $CD161+TCR\alpha\beta+$ ) u timusu neonatalno androgenizovanih u odnosu na kontrolne životinje (Slika 16).



**Slika 16. Uticaj neonatalne androgenizacije na procenat i ukupan broj  $CD161+TCR\alpha\beta+$  timocita.** Histogrami predstavljaju (levo) procenat i (desno) ukupan broj  $CD161+TCR\alpha\beta+$  ćelija u suspenzijama timocita izolovanih iz neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih životinja (Kontrola). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\* $p < 0.01$ .

#### ***4.1.8. Uticaj neonatalne androgenizacije na sveže timusne emigrante, konvencionalne i regulatorne T-limfocite u perifernoj krvi i slezini***

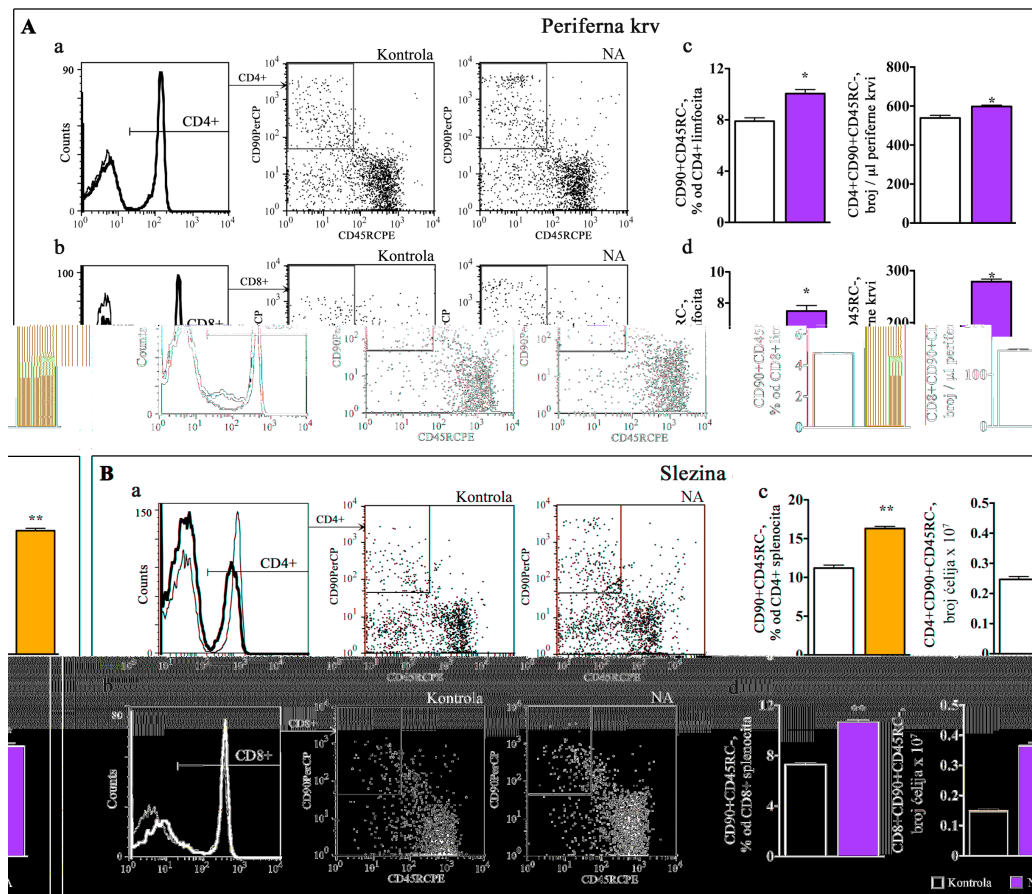
Kako bi u potpunosti sagledali značaj promena u timopoezi izazvanih jednokratnim davanjem testosterona u kritičnom neonatalnom uzrastu, za periferni T-ćelijski odeljak analizirali smo procentualnu zastupljenost, kao i ukupan broj svežih timusnih emigranata, glavnih subpopulacija konvencionalnih ( $CD4+TCR\alpha\beta+$  i  $CD8+TCR\alpha\beta+$ ), regulatornih  $CD4+CD25+FoxP3+$  T-limfocita i NKT ćelija ( $CD161+TCR\alpha\beta+$ ) u perifernoj krvi i slezini odraslih ženki pacova.

##### ***4.1.8.1. Sveži timusni emigranti***

Kod odraslih ženki pacova koje su u kritičnom postnatalnom periodu tretirane testosteronom, došlo je do povećanja ukupnog broja najzrelijih  $CD4+JP$  i  $CD8+JP$  ćelija u timusu. Kako bi se utvrdilo, da li kod ovih životinja dolazi do povećanog stvaranja i izlaska novoformiranih ćelija iz timusa, analiziran je procenat i ukupan broj svežih timusnih emigranata u populaciji  $CD4+$  i  $CD8+$  limfocita periferne krvi i slezine (Slika 17). Kod

pacova, ove ćelije karakteriše prisustvo CD90+ i odsustvo teške izoforme CD45R molekula na membrani (Hosseinzadeh i Goldschneider, 1993).

Kod neonatalno androgenizovanih životinja pokazano je povećanje procentualne zastupljenosti svežih timusnih emigranata u populacijama CD4+ i CD8+ limfocita periferne krvi ( $p < 0.05$ ) i slezine ( $p < 0.01$ ) kao i povećanje njihovog ukupnog broja u oba analizirana limfoidna odeljka ( $p < 0.05$  u perifernoj krvi i  $p < 0.01$  u slezini) u odnosu na kontrolne životinje (Slika 17).



**Slika 17. Uticaj neonatalne androgenizacije na sveže timusne emigrante u perifernoj krvi i slezini.** Reprezentativni tačkasti protočno-fluorocitometrijski profili prikazuju izdvajanje populacije svežih timusnih emigranata (CD90+CD45RC-) na osnovu ekspresije CD90 i CD45RC molekula u populaciji CD4+ (a) i CD8+ (b) limfocita (A) periferne krvi i (B) slezine kod neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih životinja (Kontrola). (a) CD4+ i (b) CD8+ limfociti (A) periferne krvi i (B) slezine kod NA (debeli linija) i kontrolnih životinja (tanka linija) su izdvojeni kao što je prikazano na preklopljenim protočno-fluorocitometrijskim histogramima. Histogrami predstavljaju (levo) procenat i (desno) ukupan broj CD90+CD45RC- ćelija u populaciji (c) CD4+ i (d) CD8+ limfocita (A) periferne krvi i (B) slezine kod NA i kontrolnih životinja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. (n≥6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

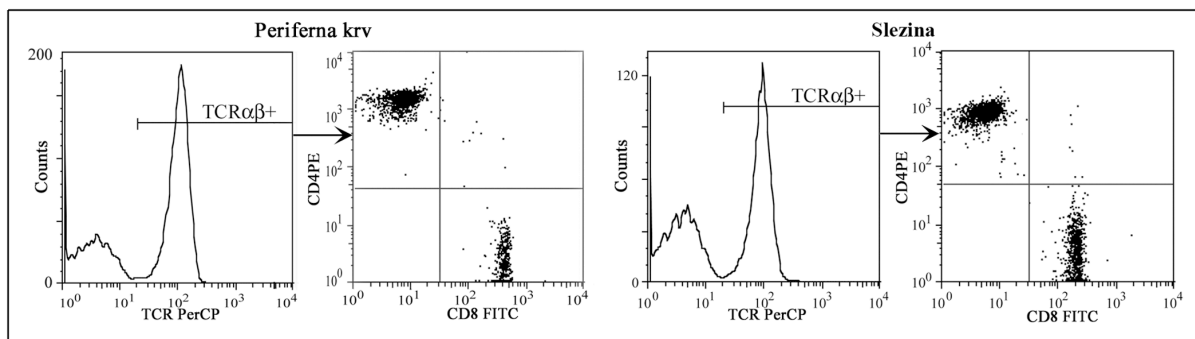
#### 4.1.8.2. TCRαβ+, CD4+ i CD8+ T-limfociti

Tretman testosteronom nije uticao na procenat TCRαβ+ limfocita u perifernoj krvi, ali je procenat ovih ćelija u slezini neonatalno androgenizovanih životinja bio značajno (p<0.05) niži u poređenju sa kontrolnim životinjama. Međutim, ukupan broj TCRαβ+

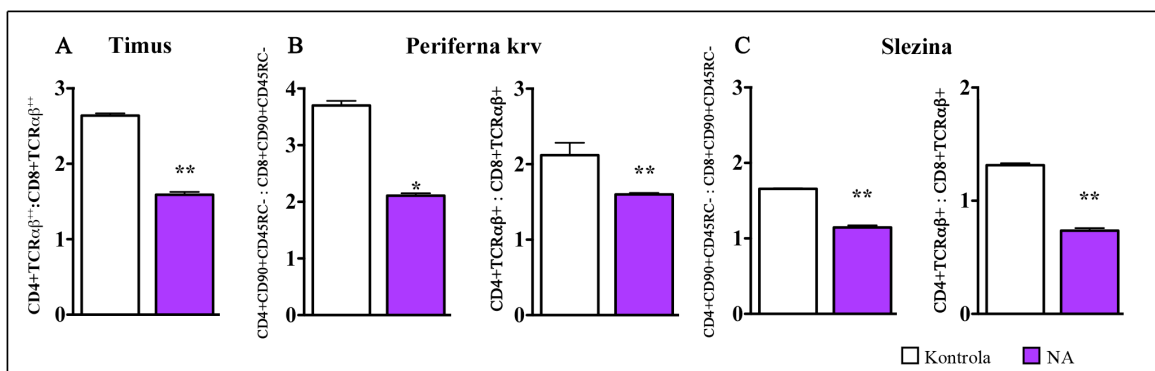
limfocita bio je značajno ( $p < 0.05$ ) povećan u oba ispitivana limfoidna odeljka neonatalno androgenizovanih ženki u odnosu na kontrolne životinje (Tabela 3).

Analizom ekspresije koreceptorskih CD4+ i CD8+ molekula u populaciji TCR $\alpha\beta$ + limfocita periferne krvi i slezine (Slika 18) utvrđeno je da je neonatalni tretman testosteronom imao suprotan efekat na procentualnu zastupljenost CD4+ i CD8+ ćelija u populaciji T-limfocita, dovodeći do statistički značajnog smanjenja procenta CD4+ ćelija u populaciji T-limfocita periferne krvi ( $p < 0.05$ ) i slezine ( $p < 0.01$ ), a povećanja procenta CD8+ ćelija u populaciji T-limfocita periferne krvi ( $p < 0.05$ ) i u slezine ( $p < 0.01$ ) kod neonatalno androgenizovanih ženki pacova u poređenju sa kontrolama (Tabela 3).

Neonatalna androgenizacija dovela je do značajnog ( $p < 0.05$ ) smanjenja ukupnog broja CD4+ TCR $\alpha\beta$ + i povećanja ( $p < 0.05$ ) ukupnog broja CD8+ TCR $\alpha\beta$ + limfocita u perifernoj krvi. Međutim, u slezini neonatalno androgenizovanih životinja došlo je do povećanja ( $p < 0.01$ ) samo ukupnog broja CD8+ TCR $\alpha\beta$ + limfocita, dok je ukupan broj CD4+ TCR $\alpha\beta$ + limfocita ostao nepromenjen (Tabela 3). Shodno tome, u perifernoj krvi i slezini ovih životinja došlo je do značajnog ( $p < 0.01$ ) smanjenja odnosa procentualne zastupljenosti CD4+TCR $\alpha\beta$ + : CD8+TCR $\alpha\beta$ + limfocita, koji se još naziva i imunoregulatorni indeks (Slika 19).



**Slika 18. Prikaz protočno-fluorocitometrijske analize trokolornog bojenja suspenzije limfocita periferne krvi i slezine monoklonskim antitelima protiv CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$ , konjugovanim sa različitim fluorohromima.** Populacija T-limfocita periferne krvi i slezine izdvojena je na osnovu ekspresije TCR $\alpha\beta$ , kao što je prikazano na protočno-fluorocitometrijskom histogramu (levo), da bi dalje bile analizirane na osnovu ekspresije CD4 i CD8 koreceptorskih molekula, kao što je pokazano na tačkastom protočno-fluorocitometrijskom profilu (desno).



**Slika 19. Uticaj neonatalne androgenizacije na odnos procentualne zastupljenosti najzrelijih, JP timocita, CD4+ i CD8+ fenotipa kao i svežih timusnih emigranata i T-limfocita CD4+ i CD8+ fenotipa u perifernoj krvi i slezini.**

Histogrami predstavljaju odnos procentualne zastupljenosti CD4+ JP TCRαβ<sup>++</sup> i CD8+ JP TCRαβ<sup>++</sup> (A) timocita, CD4+ i CD8+ svežih timusnih emigranata, kao i CD4+ i CD8+ T-limfocita (B) periferne krvi i (C) slezine kod neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih ženki pacova (Kontrola). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. (n≥6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

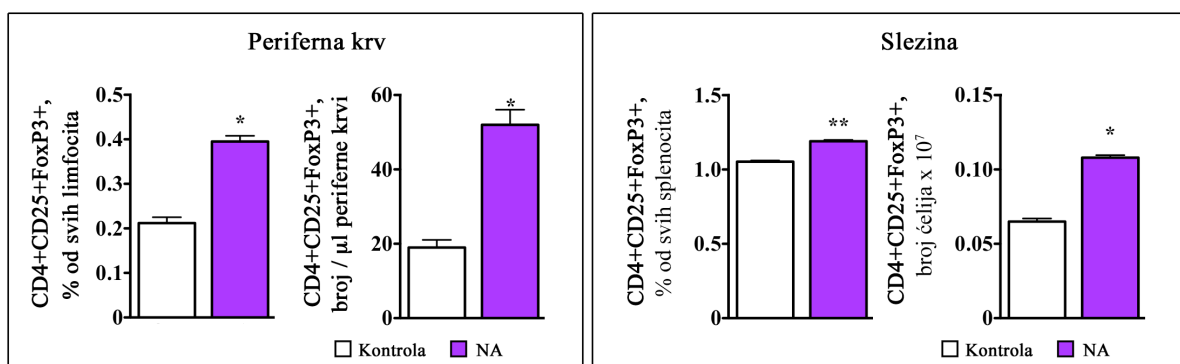
**Tabela 3. Procenat TCR $\alpha\beta$ + limfocita, procenti CD4+ i CD8+ ćelija u populaciji TCR $\alpha\beta$ + limfocita i ukupan broj ovih ćelija u perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih ženki pacova (Kontrola).**

|  | Kontrola         | NA                  |
|--|------------------|---------------------|
| <b>Procenat (%)</b>                                      |                  |                     |
| TCR $\alpha\beta$ + limfocita                            | 69.66 $\pm$ 0.65 | 73.85 $\pm$ 2.01    |
| CD4+ od TCR $\alpha\beta$ + limfocita                    | 70.70 $\pm$ 2.43 | 61.67 $\pm$ 0.73*   |
| CD8+ od TCR $\alpha\beta$ + limfocita                    | 29.29 $\pm$ 2.43 | 38.33 $\pm$ 0.73*   |
| <b>Broj limfocita / <math>\mu</math>l periferne krvi</b> |                  |                     |
| TCR $\alpha\beta$ +                                      | 8917 $\pm$ 84    | 9689 $\pm$ 267*     |
| CD4+ TCR $\alpha\beta$ +                                 | 6170 $\pm$ 245   | 5562 $\pm$ 164*     |
| CD8+ TCR $\alpha\beta$ +                                 | 2128 $\pm$ 154   | 2640 $\pm$ 35*      |
| <b>Procenat (%)</b>                                      |                  |                     |
| TCR $\alpha\beta$ + splenocita                           | 58.93 $\pm$ 0.88 | 54.90 $\pm$ 1.21(*) |
| CD4+ od TCR $\alpha\beta$ + splenocita                   | 55.13 $\pm$ 0.70 | 40.60 $\pm$ 1.79**  |
| CD8+ od TCR $\alpha\beta$ + splenocita                   | 42.03 $\pm$ 0.80 | 55.73 $\pm$ 1.62**  |
| <b>Broj splenocita x 10<sup>7</sup></b>                  |                  |                     |
| TCR $\alpha\beta$ +                                      | 3.65 $\pm$ 0.32  | 4.99 $\pm$ 0.20*    |
| CD4+ TCR $\alpha\beta$ +                                 | 2.02 $\pm$ 0.19  | 2.03 $\pm$ 0.14     |
| CD8+ TCR $\alpha\beta$ +                                 | 1.53 $\pm$ 0.12  | 2.78 $\pm$ 0.12**   |

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. (n $\geq$ 6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

#### 4.1.8.3. Ćelije CD4+CD25+FoxP3+ fenotipa

Tretman testosteronom doveo je do značajnog povećanja procenta (p<0.05 u perifernoj krvi i p<0.01 u slezini) i ukupnog broja (p<0.05) CD4+CD25+FoxP3+ limfocita u perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih u odnosu na kontrolne životinje (Slika 20).

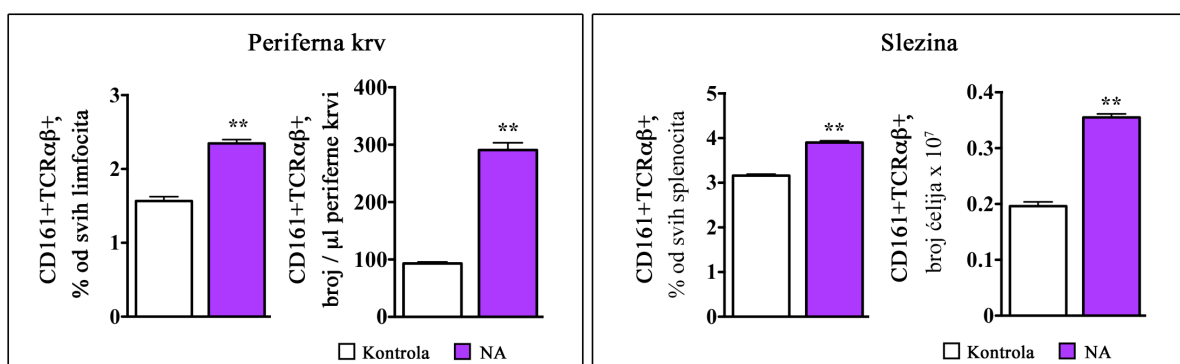


**Slika 20. Uticaj neonatalne androgenizacije na procenat i ukupan broj CD4+CD25+FoxP3+ limfocita u perifernoj krvi i slezini.**

Stubičasti histogrami predstavljaju (levo) procenat i (desno) ukupan broj CD4+CD25+FoxP3+ limfocita u perifernoj krvi i slezini kod neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih ženki pacova (Kontrola). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.1.8.4. Ćelije CD161+TCR $\alpha\beta$ + fenotipa

Kod neonatalno androgenizovanih životinja pokazano je značajno ( $p < 0.01$ ) povećanje procenta i ukupnog broja CD161+TCR $\alpha\beta$ + limfocita u perifernoj krvi i slezini u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 21).



**Slika 21. Uticaj neonatalne androgenizacije na CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelije u perifernoj krvi i slezini.** Stubičasti histogrami predstavljaju (levo) procenat i (desno) ukupan broj CD161+TCR $\alpha\beta$ + limfocita u perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih (NA) i kontrolnih životinja (Kontrola). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \*\* $p < 0.01$ .

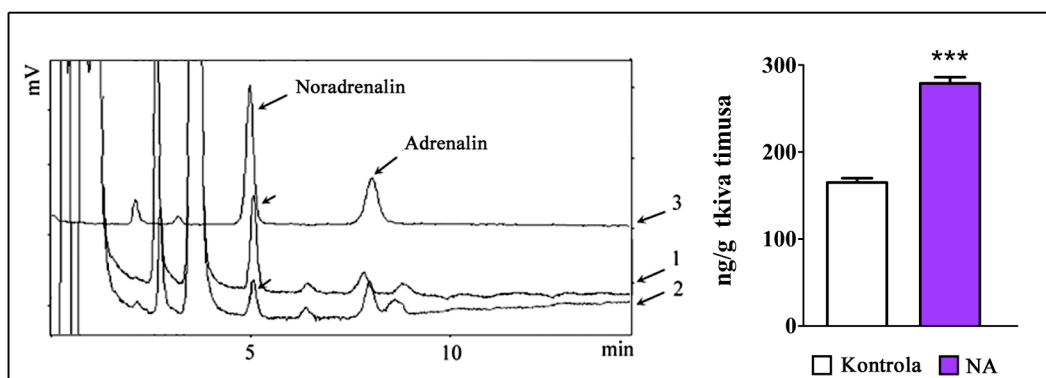
#### ***4.1.9. Uticaj neonatalne androgenizacije na koncentraciju kateholamina u timusu i ekspresiju adrenergičkih receptora na timocitima***

Pokazano je da tretman testosteronom u kritičnom neonatalnom periodu dovodi do promena u koncentraciji hormona jajnika. Imajući u vidu da hormoni jajnika utiču na nivo noradrenalina (Clarke i Kendall, 1994; Kendall i sar., 1994; Pilipović i sar., 2008) u timusu, sa jedne strane, kao i podatke koji ukazuju da kateholamini, delujući posredstvom AR modulišu apoptozu/proliferaciju timocita, kao i da utiču na ekspresiju antigena diferencijacije/sazrevanja timocita (Madden i Felten, 2001; Rauški i sar., 2003; Leposavić i sar., 2006; 2007, 2010; Pešić i sar., 2007; 2009), sa druge strane, određivana je koncentracija kateholamina u tkivu timusa kako bi se sagledali mogući indirektni, kateholaminima posredovani, efekti polnih hormona na timus.

##### ***4.1.9.1. Koncentracija kateholamina u timusu***

Primenom HPLC metode pokazano je da je jednokratno davanje testosterona u kritičnom neonatalnom uzrastu dovelo do značajnog ( $p < 0.001$ ) povećanja koncentracije noradrenalina u tkivu timusa. Prosečna vrednost koncentracije noradrenalina u timusu odraslih neonatalno androgenizovanih životinja bila je približno 70% veća od prosečne vrednosti koncentracije noradrenalina kod kontrolnih životinja (Slika 22). Za razliku od noradrenalina, adrenalin nije bio prisutan u količini koja se može detektovati ovom metodom, ili je njegova koncentracija bila samo neznatno iznad limita detekcije, što nije dozvoljavalo njegovu pouzdanu kvantifikaciju.





**Slika 22. Uticaj neonatalne androgenizacije na koncentraciju noradrenalina u timusu.**

Na slici su prikazani hromatogrami reprezentativnih uzoraka timusa (hromatogram 1) životinja tretiranih testosteronom u kritičnom neonatalnom uzrastu, (hromatogram 2) kontrolnih životinja, i (hromatogram 3) smeše standarda koja sadrži: 100 ng/ml noradrenalina i 100 ng/ml adrenalina rastvorenog u 0.4 M rastvoru perhorne kiseline. Pikovi koji odgovaraju noradrenalinu i adrenalinu označeni su strelicama. Stubičasti histogram prikazuje koncentraciju noradrenalina u timusu odraslih ženki pacova podvrgnutih jednokratnom davanju testosterona u kritičnom neonatalnom uzrastu (NA) i kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \*\*\* $p < 0.001$ .

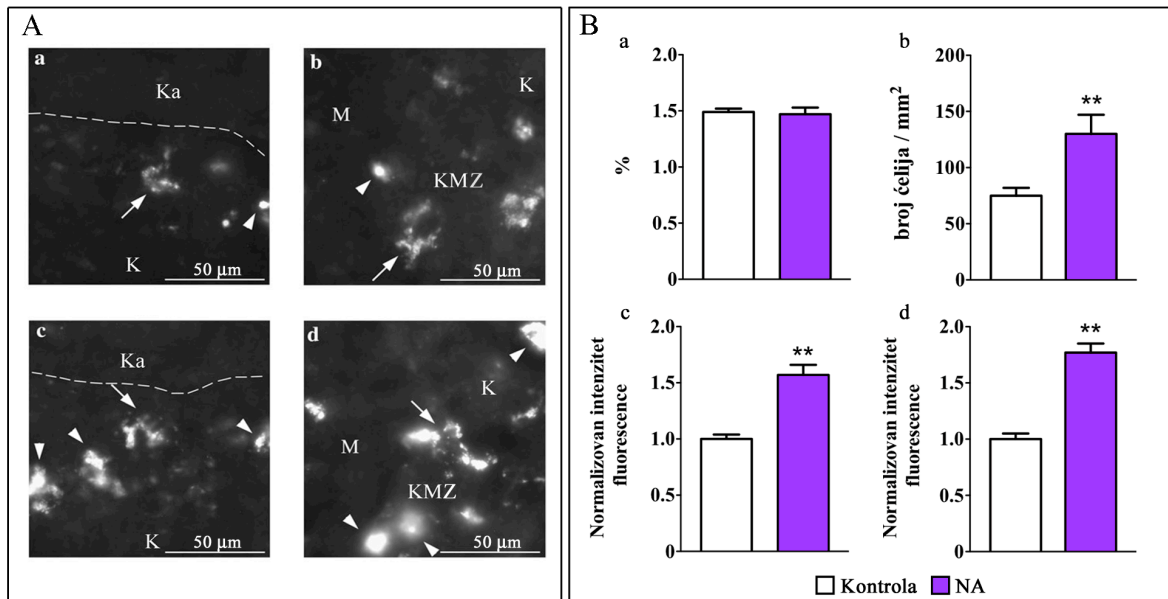
#### 4.1.9.2. Kateholaminska nervna vlakna u timusu

Pokazano je da jednokratno davanje testosterona u kritičnom neonatalnom uzrastu značajno povećava koncentraciju noradrenalina u timusu. Imajući u vidu podatke koji ukazuju na to da noradrenalinska simpatikusna nervna vlakna predstavljaju glavni izvor kateholamina u timusu (Felten i sar., 1985; Bellinger i sar., 1992; Cavallotti i sar., 1999), simpatikusna nervna vlakna su vizualizovana metodom za pobuđivanje tkivne fluorescence (SPG metod), kako bi se utvrdilo da li je povećanje koncentracije noradrenalina u timusu nakon tretmana testosteronom posledica promena u njihovoj distribuciji, gustini i/ili sadržaju kateholamina u njima.

U skladu sa nalazima dobijenim u prethodnim istraživanjima (Leposavić i sar., 1992; Cavallotti i sar., 1999), kod odraslih ženki pacova fluorescentni nervni profili su uočeni, uglavnom, u kapsuli, septama, subkapsularnom regionu i KMZ, a retki fluorescentni profili mogli su se uočiti u parenhimu korteksa i medule (Slika 23).

Značajnije razlike u topografiji i gustini kateholaminskih nervnih profila nisu zapažene na presecima timusa neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja. Međutim, kvantifikacijom intenziteta fluorescentnog signala koji su emitovala kateholaminska vlakna nakon tretmana SPG rastvorom, pokazano je da su kateholaminska vlakana na presecima timusa neonatalno androgenizovanih životinja emitovala fluorescentni signal većeg intenziteta u odnosu na kontrolne životinje (Slika 23).

Kao što je prethodno pokazano (Leposavić i sar., 1992), na presecima timusa nakon primene SPG metode uočavaju se i autofluorescentne ćelije. Ove ćelije su uglavnom locirane u predelu KMZ, i najverovatnije odgovaraju TEC, makrofagama i mastocitima (Muller i Weihe, 1991; Artico i sar., 2002; Pilipović i sar., 2008). Gustina ovih ćelija kao i intenzitet autofluorescentnog signala koji su emitovale nakon tretmana SPG rastvorom, bili su značajno ( $p < 0.01$ ) veći na presecima tkiva timusa neonatalno androgenizovanih u odnosu na kontrolne životinje istog uzrasta. Budući da je pokazano da populacije ćelija, locirane uglavnom u KMZ timusa pacova i koje prema morfologiji odgovaraju makrofagama, sadrže granule autofluorescentnog lipofuscina (Milićević i sar., 1986), kontrolni preseki obe grupe životinja, prekrivani su mineralnim uljem umesto SPG rastvorom i tretirani SPG metodom. Intenzitet fluorescence, kao i broj autofluorescentnih ćelija na presecima timusa, nije se značajno razlikovao između neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja.



**Slika 23. Uticaj neonatalne androgenizacije na distribuciju, gustinu i intenzitet fluorescence kateholaminskih vlakana i autofluorescentnih ćelija u timusu.**

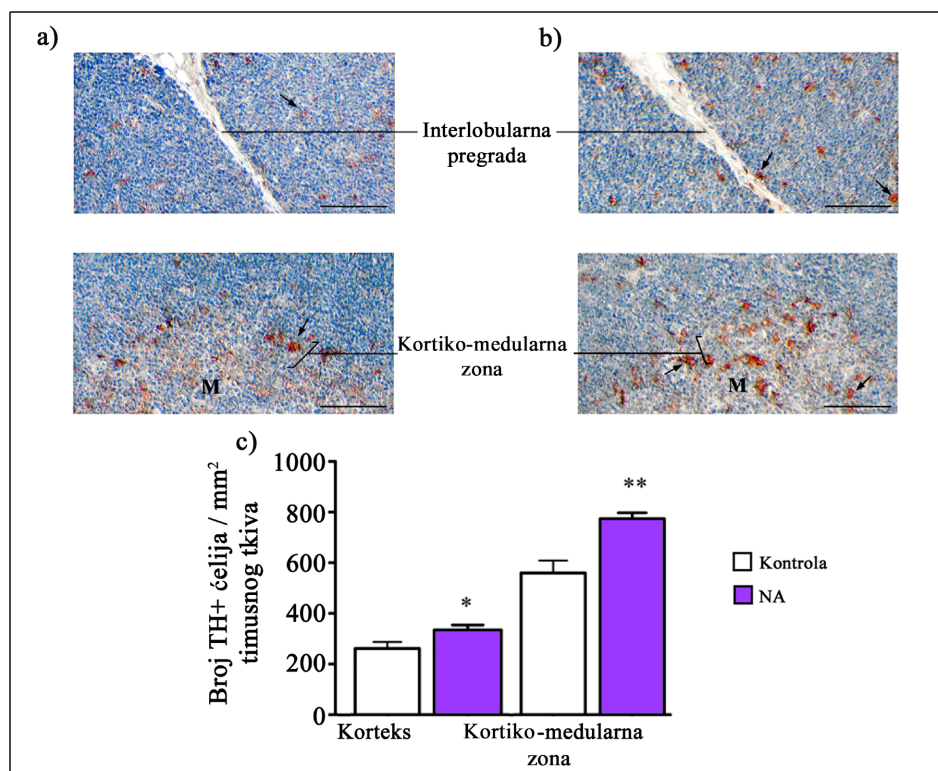
(A) Kateholaminska nervna vlakna i autofluorescentne ćelije vizualizovane metodom za pobuđivanje tkivne fluorescence (SPG metoda). Reprezentativne fotomikrografije preseka timusa prikazuju: fluorescentne nervne profile u (a, c) kortikalnom (b, d) kortiko-medularnom/medularnom odeljku timusa ženki pacova neonatalno podvrgnutih jednokratnom davanju testosterona (c, d) i kontrolnih životinja istog uzrasta (a, b). Strelice prikazuju fluorescentna nervna vlakna, a vrh strelice autofluorescentne ćelije. Ka, kapsula; Uveličanje x 40, K, korteks; KMZ, kortiko-medularna zona; M, medula.

(B) Histogrami prikazuju (a) procentualnu zastupljenost fluorescentnih nervnih vlakana (procenat analizirane površine koju pokrivaju fluorescentni nervni profili), (b) gustinu autofluorescentnih ćelija (broj ćelija /mm<sup>2</sup> preseka timusa), digitalno kvantifikovan intenzitet fluorescentnog signala koji emituju (c) nervna vlakna i (d) autofluorescentne ćelije na presecima tkiva timusa ženki pacova neonatalno podvrgnutih jednokratnom davanju testosterona (NA) i kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.1.9.3. Ćelije koje sintetišu kateholamine u timusu

Imajući u vidu činjenicu da i timusne ćelije sadrže i sintetišu kateholamine (Pilipović i sar., 2008), ispitivali smo ekspresiju tirozin hidrosilaze (TH), enzima koji katalizuje konverziju tirozina u 3,4-dihidroksifenilalanin i predstavlja limitirajući faktor u

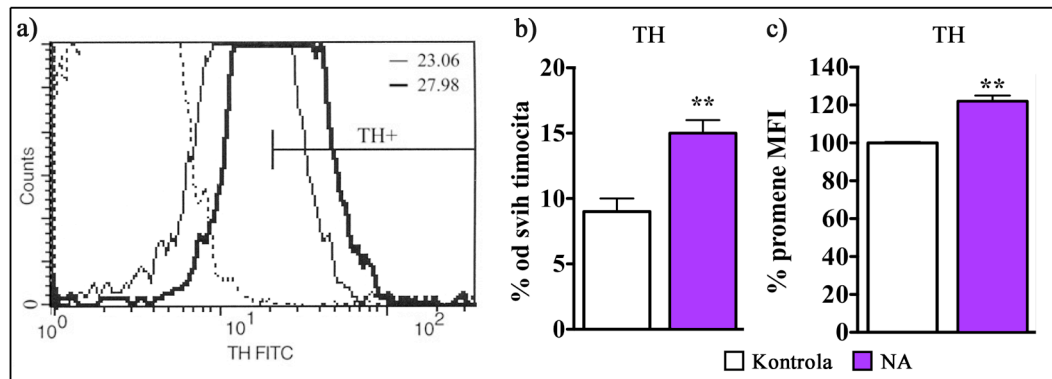
sintezi kateholamina. Čelije koje ispoljavaju TH (TH+ ćelije) uočene su, uglavnom, u subkapsularnom regionu i na medularnoj strani KMZ, dok je samo mali broj ćelija zapažen u parenhimu korteksa i medule. Kao što je očekivano (Pilipović i sar., 2008), pored nelimfoidnih ćelija, na presecima timusa odraslih ženki pacova detektovani su i TH+ timociti. Timusna distribucija ovih ćelija nije se razlikovala kod neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja. Kvantifikacijom TH+ ćelija u timusnim odeljcima/subodeljcima pokazano je da je davanje testosterona u kritičnom neonatalnom periodu dovelo do povećanja površinske gustine TH+ ćelija u subkapsularnom/subseptalnom odeljku timusa ( $p < 0.05$ ) kao i na medularnoj strani KMZ i intramedularno ( $p < 0.01$ ) (Slika 24).



**Slika 24. Uticaj jednogodišnjeg ubrizgavanja testosterona u kritičnom neonatalnom periodu na distribuciju i gustinu zastupljenosti ćelija koje ispoljavaju tirozin hidroksilazu u timusu**

Reprezentativne fotomikrografije timusnih preseka pacova (a) neonatalno podvrgnutih jednogodišnjem davanju testosterona (NA) i (b) kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola) bojenih imunohistochemijskom metodom korišćenjem monoklonskih antitela specifičnih za tirozin hidroksilazu (TH). Uveličanje x10. K, korteks; M, medula; (c). Na histogramu je prikazana gustina (broj ćelija /mm<sup>2</sup> preseka timusa) TH+ limfoidnih i nelimfoidnih ćelija u korteksu i kortiko-medularnom/medularnom odeljku timusa odraslih NA i kontrolnih ženki pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. (n≥6). \*p<0.05; \*\*p<0.01.

U skladu sa prethodnim nalazom, metodom jednokolorne protočne fluorocitometrije pokazano je da je procentualna zastupljenost TH+ timocita značajno (p<0.05) veća u suspenziji timocita neonatalno androgenizovanih nego kod kontrolnih životinja (Slika 25). Osim toga, povećana vrednost MFI za TH u timocitima kod ovih životinja ukazuje i na povećanu gustinu zastupljenosti ovog enzima u TH+ ćelijama (Slika 25).



**Slika 25. Uticaj neonatalne androgenizacije na ekspresiju tirozin hidroksilaze u timocitima.**

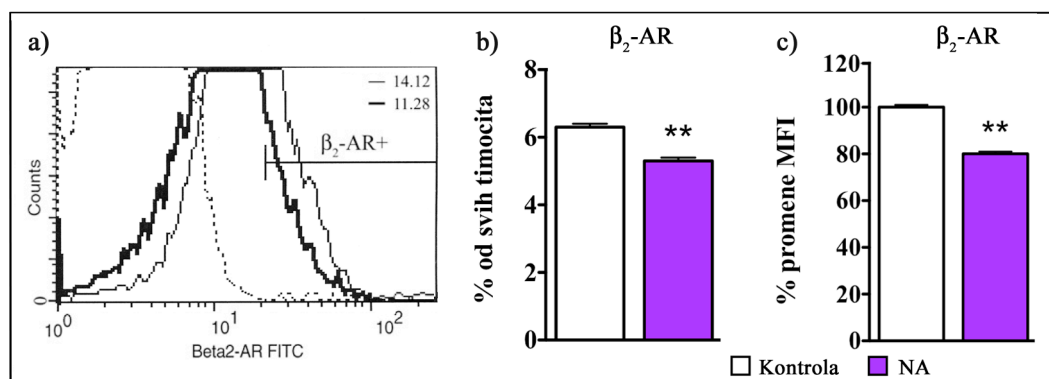
(a) Reprezentativni protočno-fluorocitometrijski profili prikazuju ekspresiju tirozin hidroksilaze (TH) kao i odgovarajuće vrednosti srednjeg intenziteta fluorescence (MFI) u suspenziji timocita (široka linija) odraslih ženki pacova neonatalno podvrgnutih jednokratnom davanju testosterona (NA) i (tanka linija) kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola). Isprekidana linija označava izotipsku kontrolu.

Stubičasti histogrami predstavljaju (b) procenat TH+ ćelija i (c) promenu MFI koju emituje fluorohrom vezan za monoklonsko antitelo specifično za TH u suspenziji timocita NA i kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.1.9.4. Ekspresija $\beta_2$ -adrenergičkih receptora na timocitima

Imajući u vidu podatke koji ukazuju da hormoni jajnika utiču na ekspresiju  $\beta$ -AR u timusu (Marchetti i sar., 1990; 1994), analizirali smo ekspresiju ovih receptora na timocitima neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja.

Metodom jednokolorne FCA utvrđeno je da je kod odraslih neonatalno androgenizovanih ženki procentualna zastupljenost  $\beta_2$ -AR+ timocita bila značajno ( $p < 0.01$ ) niža u odnosu na kontrolne životinje. Pored toga, na timocitima neonatalno androgenizovanih životinja pokazano je i značajno ( $p < 0.01$ ) smanjenje MFI za  $\beta_2$ -AR, što ukazuje na smanjenu gustinu ekspresije  $\beta_2$ -AR kod ovih životinja (Slika 26).



**Slika 26. Uticaj neonatalne androgenizacije na ekspresiju  $\beta_2$ -adrenergičkih receptora na timocitima**

(a) Reprezentativni protočno-fluorocitometrijski prikazi ekspresije  $\beta_2$ -adrenergičkih receptora ( $\beta_2$ -AR) kao i odgovarajuće vrednosti srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI) u suspenziji timocita (široka linija) odraslih ženki pacova neonatalno podvrgnutih jednokratnom davanju testosterona (NA) i (tanka linija) kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola). Isprekidanom linijom označena je izotipska kontrola.

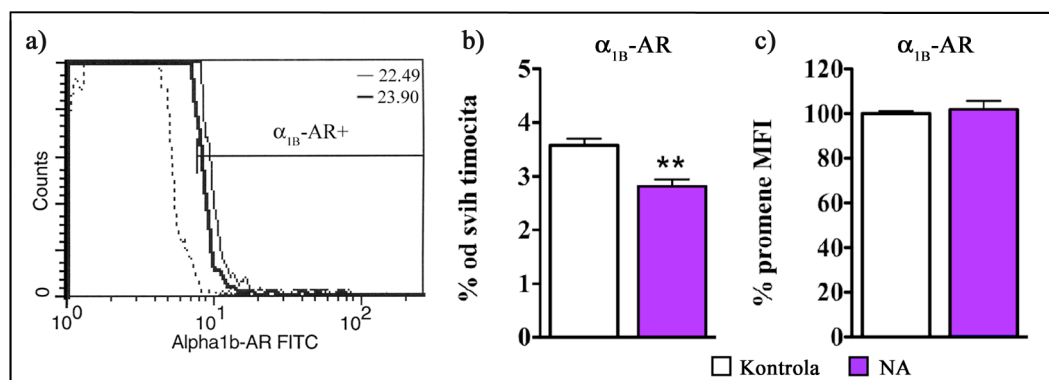
Stubičasti histogrami predstavljaju (b) procenat  $\beta_2$ -AR+ ćelija i (c) promenu MFI koji emituje fluorohrom vezan za antitelo specifično za  $\beta_2$ -AR u suspenziji timocita NA i kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.1.9.5. Ekspresija $\alpha_{1B}$ -adrenergičkih receptora na timocitima

Iako se smatra da se modulatorni uticaj kateholamina na sazrevanje timocita uglavnom odvija posredstvom  $\beta_2$ -AR (Elenkov i sar., 2000), novijim studijama pokazano je da dugotrajni tretman antagonistom  $\alpha_1$ -AR dovodi do povećanja celularnosti timusa i promena u procesu diferencijacije/sazrevanja timocita (Pešić i sar., 2009; Lepasavić i sar., 2010). Imajući u vidu podatke koji ukazuju da je kod pacova, u moždanom tkivu i u tkivu uterusa, ekspresija  $\alpha_1$ -AR zavisna od nivoa hormona jajnika (Roberts i sar., 1981; Wilkinson i Herdon, 1982; Shackelford i sar., 1987; Roberts i sar., 1989), analizirana je ekspresija  $\alpha_1$ -AR na timocitima.

U suspenzijama timocita neonatalno androgenizovanih životinja procentualna zastupljenost  $\alpha_{1B}$ -AR+ timocita bila je značajno ( $p < 0.01$ ) niža u odnosu na suspenzije timocita kontrolnih životinja, dok je gustina ekspresije ovih receptora na  $\alpha_{1B}$ -AR+

ćelijama, sudeći prema vrednosti MFI za  $\alpha_{1B}$ -AR, ostala nepromenjena (Slika 27).



**Slika 27. Uticaj neonatalne androgenizacije na ekspresiju  $\alpha_{1B}$ -adrenergičkih receptora na timocitima.**

(a) Reprezentativni protočno-fluorocitometrijski prikazi ekspresije  $\alpha_{1B}$ -adrenergičkih receptora ( $\alpha_{1B}$ -AR) kao i odgovarajuće vrednosti srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI) u suspenziji timocita (široka linija) odraslih neonatalno androgenizovanih ženki pacova (NA) i (tanka linija) kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola). Isprekidanom linijom označena je izotipska kontrola.

Stubičasti histogrami predstavljaju (b) procenat  $\alpha_{1B}$ -AR+ ćelija i (c) promenu MFI koji emituje fluorohrom vezan za antitelo specifično za  $\alpha_{1B}$ -AR u suspenziji timocita NA i kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \* $p < 0.05$ .



## 4.2. Uticaj uklanjanja jajnika na timus 11 meseci starih ženki pacova

Da bi se odgovorilo na pitanje da li hormoni jajnika utiču na održavanje/progresiju involucije timusa, ženkama pacova u uzrastu od 10 meseci, kada su već uznapredovale involutivne promene u građi i funkciji timusa (Perišić i sar., 2010), uklonjeni su jajnici i nakon 30. dana analizirana je masa timusa i broj timocita, građa timusa, kao i različiti parametri timusne funkcije.

### 4.2.1. Koncentracija estradiola i progesterona u serumu

Kako bi se potvrdila efikasnost ovarijskektomije, koncentracija estradiola i progesterona određivana je u serumima 11 meseci starih ženki pacova kojima su jajnici uklonjeni u uzrastu od 10 meseci: ovarijskektomisanih (OVX), „lažno“ ovarijskektomisanih (Sham-OVX) i kontrolnih životinja istog uzrasta. Kako se koncentracija analiziranih hormona nije značajno razlikovala između intaktnih i Sham-OVX, ove dve grupe su u svim narednim analizama tretirane kao jedna grupa životinja. Uklanjanje jajnika u uzrastu od 10 meseci imalo je za posledicu smanjenje koncentracije estradiola ( $p < 0.01$ ) i progesterona ( $p < 0.05$ ) u serumu ovarijskektomisanih u poređenju sa kontrolnim životinjama (Tabela 4). Pored toga, merenjem mase uterusa kontrolnih i ovarijskektomisanih životinja pokazano je značajno ( $p < 0.01$ ) smanjenje mase uterusa kod ovarijskektomisanih životinja ( $0.17 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$ ) u poređenju sa kontrolama ( $0.63 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$ ).

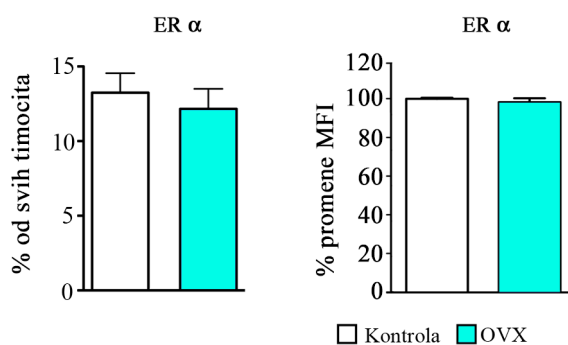
**Tabela 4. Koncentracija estradiola i progesterona u serumu ovarijskektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola).**

| Grupa                     | Estradiol<br>( pg/ml ) | Progesteron<br>( nmol/ml ) |
|---------------------------|------------------------|----------------------------|
| <b>Kontrola (n&gt;11)</b> | 74.97 ± 7.11           | 96.20 ± 16.91              |
| <b>OVX (n=6)</b>          | 22.75 ± 0.75**         | 0.87 ± 0.19*               |

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM; \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.2.2. Ekspresija receptora za estrogen

Analizom ekspresije ER $\alpha$  u suspenzijama timocita 11 meseci starih pacova, kojima su uklonjeni jajnici, nije zabeležena statistički značajna promena u procentualnoj zastupljenosti timocita koji ispoljavaju ER $\alpha$ , kao ni gustine ekspresije ovih receptora, sudeći prema MFI za ER $\alpha$ , u odnosu na kontrolne životinje istog uzrasta (Slika 28).



**Slika 28. Uklanjanje hormona jajnika nije uticalo na ekspresiju receptora za estrogen u timocitima.**

Stubičasti histogrami predstavljaju (levo) procenat ćelija koje ispoljavaju receptor za estrogen (ER) subtipa  $\alpha$  i (desno) promenu vrednosti srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI) koju emituje fluorohrom vezan za antitelo specifično za ER $\alpha$  u suspenziji timocita izolovanih iz ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih ženki pacova (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ).

#### 4.2.3. Masa timusa i broj timocita

Analizom mase timusa i broja timocita pokazano je da je ovarijektomija dovela do značajnog ( $p < 0.01$ ) povećanja mase timusa kao i ukupnog broja timocita u poređenju sa kontrolnim životinjama. Relativna masa timusa kao i relativan broj timocita bili su značajno ( $p < 0.01$ ) viši kod ovarijektomisanih u odnosu na kontrolne životinje. Pored toga, važno je naglasiti da su svi analizirani parametri bili značajno viši kod ovarijektomisanih životinja u poređenju sa 10 meseci starim kontrolnim životinjama.

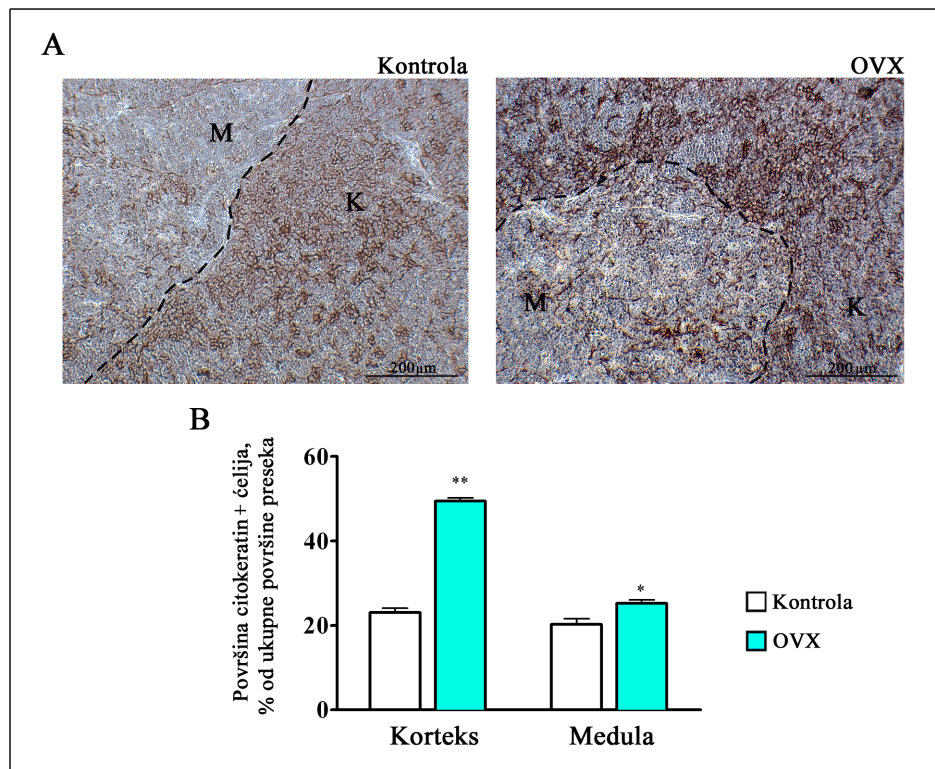
**Tabela 5. Masa timusa, relativna masa timusa, ukupan i relativan broj timocita kod 11 meseci starih ženki pacova kojima su uklonjeni jajnici (OVX), kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola) i 10 meseci starih intaktnih ženki pacova.**

| Grupa                  | Masa timusa (g)                   | Relativna masa timusa (g/100 g TM) | Broj timocita ( $\times 10^7$ )/timus | Relativni broj timocita (broj $\times 10^7/100$ g TM) |
|------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---|
| <b>10 meseci stare</b> |                                   |                                    |                                       |   |
| <b>životinje (n=5)</b> | 0.14 $\pm$ 0.01                   | 0.07 $\pm$ 0.001                   | 19.70 $\pm$ 3.34                      | 10.11 $\pm$ 1.51                                      |
| <b>Kontrola (n=11)</b> | 0.11 $\pm$ 0.02                   | 0.05 $\pm$ 0.005                   | 16.27 $\pm$ 1.87                      | 7.95 $\pm$ 0.99                                       |
| <b>OVX (n=7)</b>       | 0.40 $\pm$ 0.02 <sup>a**,b*</sup> | 0.18 $\pm$ 0.01 <sup>a**,b**</sup> | 65.88 $\pm$ 3.88 <sup>a**,b*</sup>    | 29.08 $\pm$ 1.57 <sup>a**,b**</sup>                   |

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; TM, telesna masa; <sup>a</sup> OVX vs Kontrola; <sup>b</sup> OVX vs intaktne životinje uzrasta 10 meseci.

#### 4.2.4. Zastupljenost timusnih epitelnih ćelija

Imunocitohemijska analiza zastupljenosti ćelija koje ispoljavaju citokeratine (1, 5, 6 i 8) na presecima timusa pokazala je da je kod ovarijektomisanih životinja došlo do značajnog povećanja površinske gustine TEC u timusnom korteksu ( $p < 0.01$ ) i meduli ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne životinje (Slika 29).



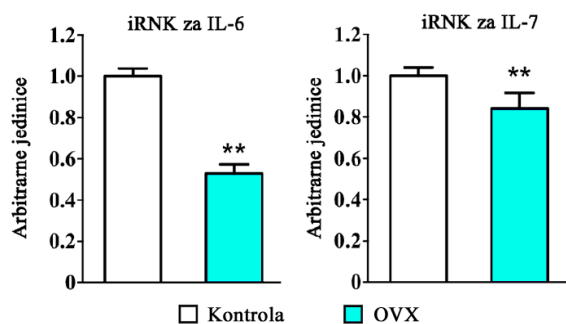
**Slika 29. Uticaj ovarijektomije na zastupljenost timusnih epitelnih ćelija.**

(A) Reprezentativne fotomikrografije preseka timusa ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola) na kojima se uočavaju imunocitohemijski obeležene timusne epitelne ćelije, TEC. Uveličanje x 10. K, korteks; M, medula; S, septa.

(B) Histogram predstavlja površinsku gustinu TEC (% površine citokeratin+ ćelija od ukupne analizirane površine preseka timusa) u spoljašnjem i unutrašnjem korteksu (uključujući i KMZ), kao i u meduli timusa OVX i kontrolnih životinja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.2.5. Ekspresija gena za IL-6 i IL-7

Jednomesečni deficit hormona jajnika doveo je do značajnog ( $p < 0.01$ ) smanjenja nivoa iRNK kako za IL-6 tako i za IL-7 (Slika 30).



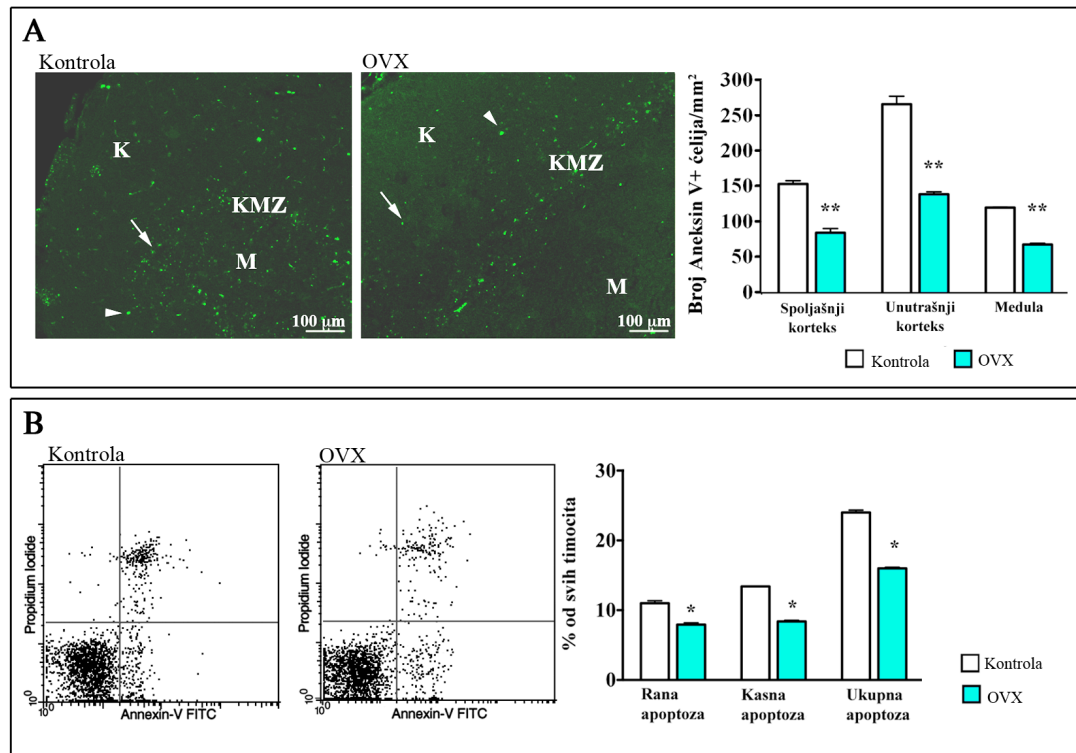
**Slika 30. Uticaj ovarijektomije na ekspresiju gena za IL-6 i IL-7 u tkivu timusa.** Histogrami prikazuju promenu nivoa ekspresije iRNA za IL-6 (levo) i IL-7 (desno) u tkivu timusa ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). Budući da je pokazano da je ekspresija gena za  $\beta$ -aktin stabilna u tkivu timusa različitih kontrolnih i eksperimentalnih životinja, iRNA za  $\beta$ -aktin korišćena je kao endogena kontrola. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\* $p < 0.01$

#### 4.2.6. Apoptoza i proliferacija timocita

##### 4.2.6.1. Apoptoza timocita

Na preseccima tkiva timusa 11 meseci starih ženki pacova, aneksinom V obojene ćelije (aneksin V+ ćelije), uočene su u svim timusnim odeljcima, ali je njihovo prisustvo bilo najupadljivije u predelu KMZ. Pored timocita koji su pokazivali membransko bojenje aneksinom V obeleženim sa FITC, uočene su, kao i kod 3 meseca starih životinja iz prethodne grupe eksperimenata, i ćelije nalik na makrofage i TNC sa citoplazmatskim bojenjem aneksinom V obeleženim FITC. Kvantifikacija aneksin V+ ćelija je pokazala da je ovarijektomija dovela do značajnog ( $p < 0.01$ ) smanjenja prosečnog broja aneksin V+ ćelija u spoljašnjem i unutrašnjem korteksu (uključujući i KMZ) kao i u meduli u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 31).

Pored toga, pokazano je da je procenat apoptotičnih ćelija bio značajno ( $p < 0.05$ ) niži u 18-časovnim kulturama timocita izolovanih iz ovarijektomisanih nego u kulturi timocita izolovanih iz kontrolnih životinja. Smanjenje učestalosti apoptotičnih ćelija odražavalo je smanjenje ( $p < 0.05$ ) učestalosti ćelija u obe faze apoptoze.



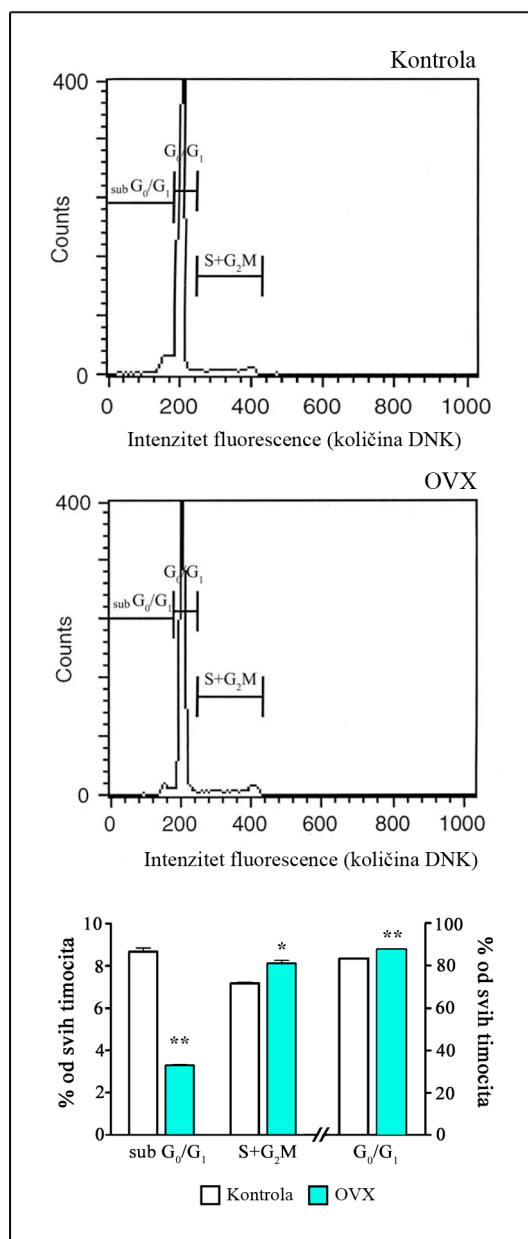
**Slika 31. Uticaj ovarijektomije na apoptozu timocita.**

(A) Reprezentativne fotomikrografije (levo) preseka timusa obojenih aneksinom V za koji je vezana fluorescentna boja FITC. AneksinV+ timociti (strelica) uočeni su u svim odeljcima timusa dok su ćelije nalik na makrofage i timusne ćelije dadilje, sa citoplazmatskim bojenjem aneksinom V (glava strelice) uočene uglavnom na kortiko-medularnoj zoni (KMZ) timusa ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). Uveličanje x10. Histogram (desno) predstavlja gustinu apoptotičnih ćelija (broj aneksin V+ ćelija /mm<sup>2</sup> preseka timusa) u spoljašnjem i unutrašnjem korteksu (uključujući i KMZ), kao i u meduli timusa OVX i kontrolnih životinja. K, korteks; M, medula;

(B) Reprezentativni tačkasti fluorocitometrijski profili (levo) vezivanja aneksina V/PI u kulturi timocita izolovanih iz OVX i kontrolnih životinja (Kontrola). Na osnovu vezivanja aneksina V/PI razdvojene su: žive ćelije (aneksin V-/PI-), ćelije u ranoj fazi apoptoze (aneksin V+/PI-), kao i ćelije u uznapredovaloj/kasnoj apoptozi (aneksin V+/PI+). Terminom ukupna apoptoza označen je procenat ćelija u ranoj (aneksinV+/PI-) i uznapredovaloj/kasnoj (aneksinV+/PI+) apoptozi. Histogram (desno) predstavlja procenat ćelija u ranoj i kasnoj fazi apoptoze kao i ukupan procenat apoptotičnih ćelija u 18-časovnoj kulturi timocita izolovanih iz OVX i kontrolnih životinja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. (n $\geq$ 6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

#### 4.2.6.2. Proliferacija timocita

U suspenzijama timocita izolovanih iz ovarijektomisanih životinja analizom ugradnje PI pokazano je značajno ( $p < 0.01$ ) smanjenje procenta apoptotičnih i povećanje procenta živih ćelija ( $p < 0.01$ ) kao i procenta ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa suspenzijama timocita izolovanih iz kontrolnih životinja (Slika 32).



**Slika 32. Uticaj ovarijektomije na proliferaciju timocita odraslih ženki pacova.**

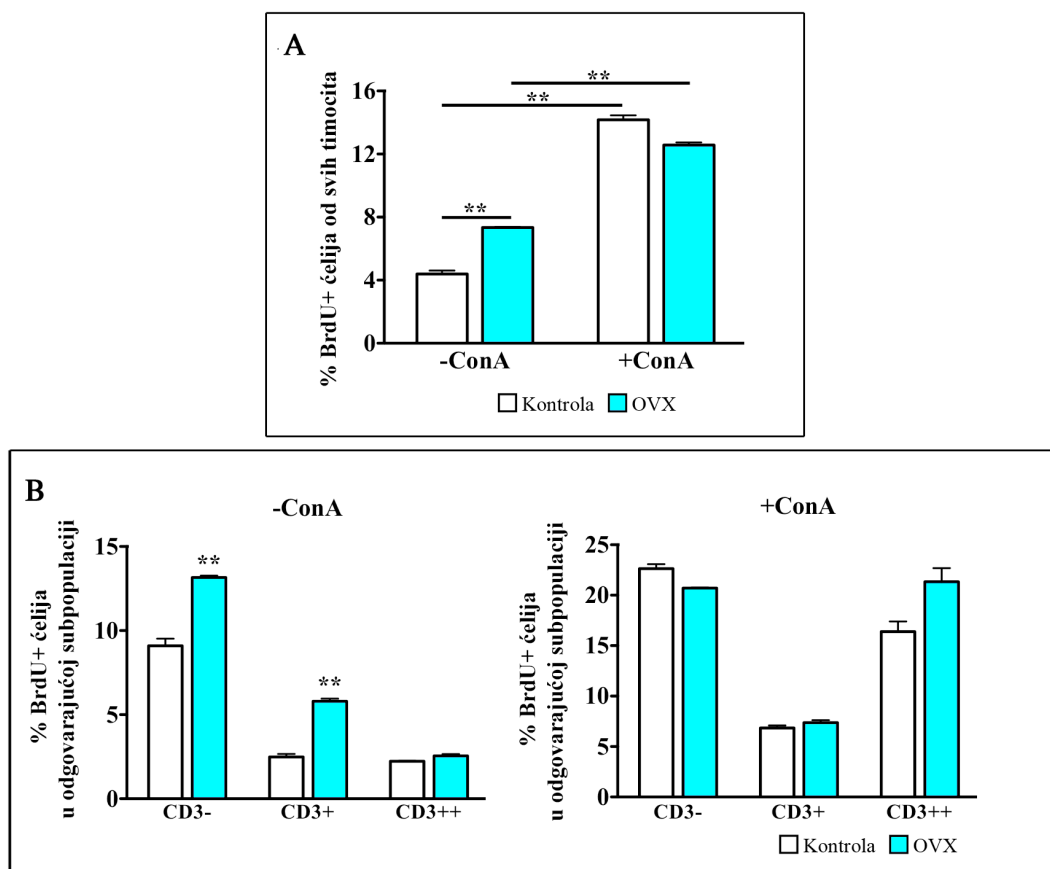
Reprezentativni protično-fluorocitometrijski histogrami prikazuju timocite u različitim fazama ćelijskog ciklusa, koji se mogu razlikovati na osnovu ugradnje PI kod ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). Na osnovu količine vezanog PI, razdvojene su: 1) ćelije koje imaju niži intenzitet fluorescencije-manji sadržaj DNK i odgovaraju apoptotičnim ćelijama (subG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>); 2) ćelije sa normalnim sadržajem DNK, koje odgovaraju ćelijama u fazi mirovanja, odnosno ćelijama koje se pripremaju za ćelijsku deobu (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>); 3) ćelije sa povećanim sadržajem DNK (S+G<sub>2</sub>M), odnosno ćelije u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa koje obuhvataju ćelije koje udvajaju DNK (S), ćelije sa udvostručenim sadržajem DNK (G<sub>2</sub>), kao i ćelije u procesu ćelijske deobe (M).

Histogrami predstavljaju procenat ćelija u SubG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> i S+G<sub>2</sub>M fazama ćelijskog ciklusa, u suspenzijama sveže izolovanih timocita OVX i kontrolnih životinja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

U kulturi timocita izolovanih iz ovarijektomisanih životinja, procenat ćelija koje su ugradile BrdU (BrdU+ ćelije) u odsustvu mitogena (ConA), bio je značajno ( $p < 0.01$ ) veći nego kod kontrolnih životinja (Slika 33). U prisustvu ConA, došlo je do značajnog ( $p < 0.01$ ) povećanja procenta BrdU+ ćelija u kulturama obe grupe životinja u poređenju sa odgovarajućim kulturama bez mitogena, ali se procenat BrdU+ ćelija nije značajno razlikovao u kulturi timocita 11 meseci starih ovarijektomisanih životinja u poređenju sa kontrolnim životinjama istog uzrasta (Slika 33).

Analizom proliferišućih ćelija u subpopulacijama timocita koje su izdvojene na osnovu nivoa ekspresije CD3 molekula pokazano je, u odsustvu ConA, značajno ( $p < 0.01$ ) povećanje procenta BrdU+ ćelija u svim subpopulacijama timocita, osim najzrelijih (CD3++) timocita, izolovanih iz ovarijektomisanih životinja u odnosu na kontrolne životinje. Međutim, u prisustvu ConA, ni u jednoj od analiziranih subpopulacija timocita ovarijektomisanih životinja, procenat BrdU+ ćelija nije se značajno razlikovao u poređenju sa odgovarajućim subpopulacijama timocita kontrolnih životinja (Slika 33).





**Slika 33. Uticaj ovarijektomije na proliferaciju timocita u kulturi.**

(A) Histogram predstavlja procenat BrdU+ ćelija u suspenziji timocita, nakon 48-časovne kultivacije, u odsustvu (-ConA) i prisustvu ConA (+ConA) kod ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). (B) Histogrami predstavljaju procenat BrdU+ ćelija u subpopulacijama timocita razdvojenih na osnovu gustine ekspresije CD3 na CD3-, CD3+ i CD3++ u suspenziji timocita izolovanih iz OVX i kontrolnih životinja, nakon 48-časovne kultivacije u odsustvu (-ConA) i prisustvu ConA (+ConA). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.2.7. Uticaj ovarijektomije na fenotipske karakteristike timocita

##### 4.2.7.1. Ekspresija CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$

###### CD4-CD8-

Ovarijektomija u uzrastu od 10 meseci dovela je do značajnog ( $p < 0.01$ ) smanjenja procentualne zastupljenosti svih subpopulacija najnezrelijih, DN timocita, razdvojenih na

osnovu ekspresije TCR $\alpha\beta$ . Međutim, kako je celularnost timusa povećana nakon ovarijektomije, ukupan broj ćelija svih subpopulacija DN timocita (TCR $\alpha\beta^-$ , TCR $\alpha\beta^+$ , TCR $\alpha\beta^{++}$ ), značajno ( $p < 0.01$ ) je porastao kod ovarijektomisanih u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 34).

#### ***CD4+CD8+***

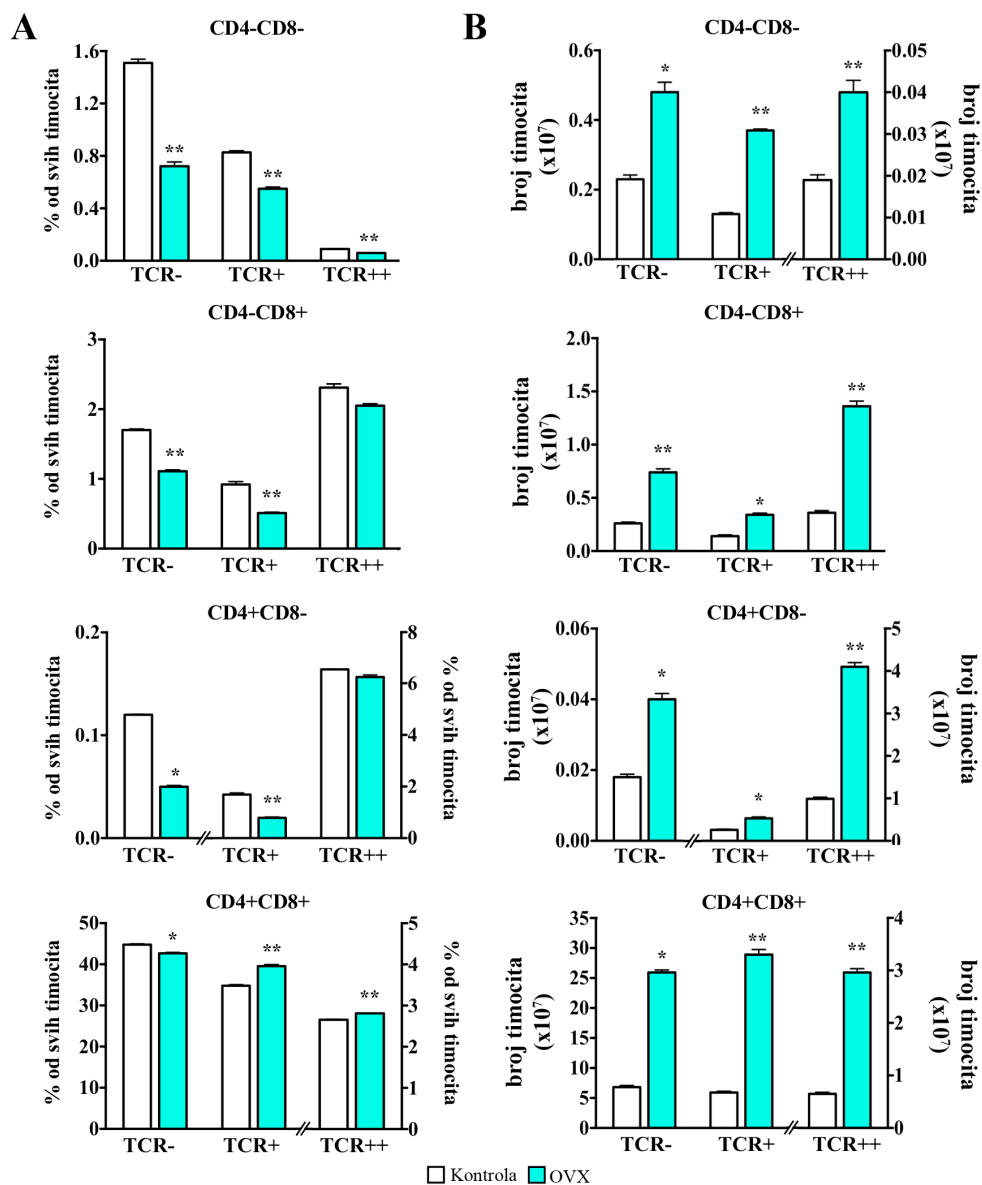
Kod ovarijektomisanih životinja došlo je do značajnog ( $p < 0.05$ ) smanjenja procenta DP TCR $\alpha\beta^-$  timocita, a povećanja ( $p < 0.01$ ) procenta timocita koje ulaze u pozitivnu selekciju, DP TCR $\alpha\beta^+$  (Zamoyska i Lovatt, 2004), kao i pozitivno selektovanih, DP TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita (Shortman i sar., 1991; Zamoyska i Lovatt, 2004), u poređenju sa kontrolnim životinjama. Pored toga, ukupan broj timocita svih ispitivanih subpopulacija DP timocita značajno je povećan kod ovarijektomisanih u odnosu na kontrolne životinje (Slika 34).

#### ***CD4+CD8-***

Procentat CD4+JP TCR $\alpha\beta^-$  i CD4+JP TCR $\alpha\beta^+$  timocita je značajno (TCR $\alpha\beta^-$ ,  $p < 0.05$  i TCR $\alpha\beta^+$ ,  $p < 0.01$ ) smanjen, dok je procenat najzrelijih, CD4+JP TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita ostao nepromenjen u suspenziji timocita ovarijektomisanih u poređenju sa kontrolnim životinjama. Za razliku od procenta, ovarijektomija je dovela do značajnog ( $p < 0.05$ ) povećanja ukupnog broja ćelija sve tri subpopulacije CD4+JP timocita u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 34).

#### ***CD4-CD8+***

Slično kao i u populaciji CD4+JP timocita, uklanjanje hormona jajnika dovelo je do značajnog ( $p < 0.01$ ) smanjenja procenta najnezrelijih, CD8+JP TCR $\alpha\beta^-$  i CD8+JP TCR $\alpha\beta^+$  timocita, dok je procenat najzrelijih, CD8+JP TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita ostao nepromenjen u poređenju sa kontrolnim životinjama istog uzrasta. Ukupan broj ćelija u sve tri ispitivane subpopulacije CD8+JP timocita značajno ( $p < 0.01$ ) je povećan kod ovarijektomisanih u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 34).



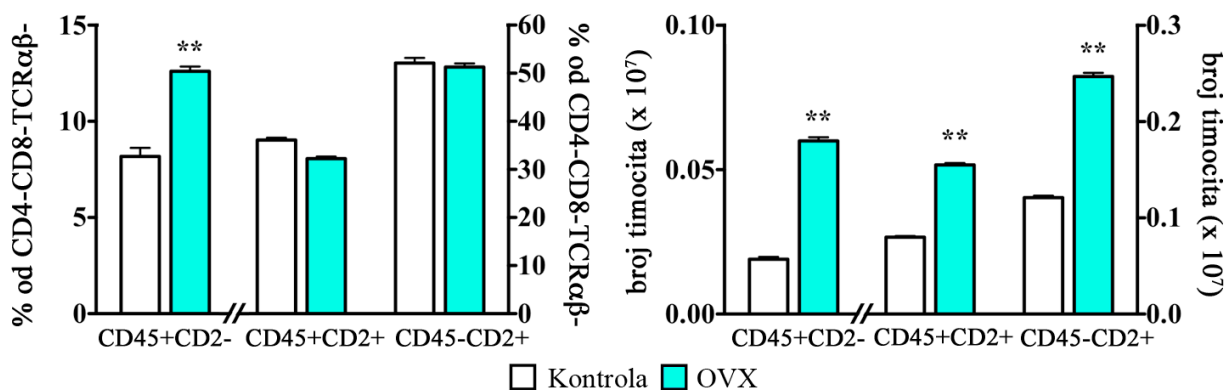
**Slika 34. Uticaj ovarijektomije na procenat i ukupan broj timocita u različitim stadijima diferencijacije/sazrevanja koji su razdvojeni na osnovu ekspresije CD4/CD8/TCR $\alpha\beta$  markera.**

Histogrami predstavljaju (A) procenat i (B) ukupan broj ćelija sa različitim nivoom ekspresije TCR $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta$ - nedetektabilna; TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, niska i TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup>, visoka ekspresija TCR $\alpha\beta$ ) u okviru populacija timocita razdvojenih na osnovu ekspresije CD4 i CD8 molekula (CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+) kod ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. (n $\geq$ 6) \*p<0.05; \*\*p<0.01.

Kako je povećanje brojnosti najzrelijih CD4+JP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> i CD8+JP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> timocita bilo srazmerno, odnos njihovih procentualnih zastupljenosti (CD4+JP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> : CD8+JP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>) u timusu ovarijektomisanih ( $3.06 \pm 0.13$ ) u odnosu na kontrolne životinje istog uzrasta ( $2.87 \pm 0.15$ ) nije se statistički značajno promenio.

#### 4.2.7.2. Ekspresija TCR $\alpha\beta$ , CD2 i CD45RC molekula na CD4-CD8- timocitima

Analizom subpopulacija TN timocita, razdvojenih na osnovu ekspresije CD2 i CD45RC molekula pokazano je da ovarijektomija dovodi do značajnog ( $p < 0.01$ ) povećanja procenta najnezrelijih CD45RC+CD2- ćelija. Procentualna zastupljenost ostalih subpopulacija TN timocita nije se značajno razlikovala između ovarijektomisanih i kontrolnih životinja. Ukupan broj ćelija u sve tri ispitivane subpopulacije TN timocita značajno ( $p < 0.01$ ) je povećan kod ovarijektomisanih u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 35).

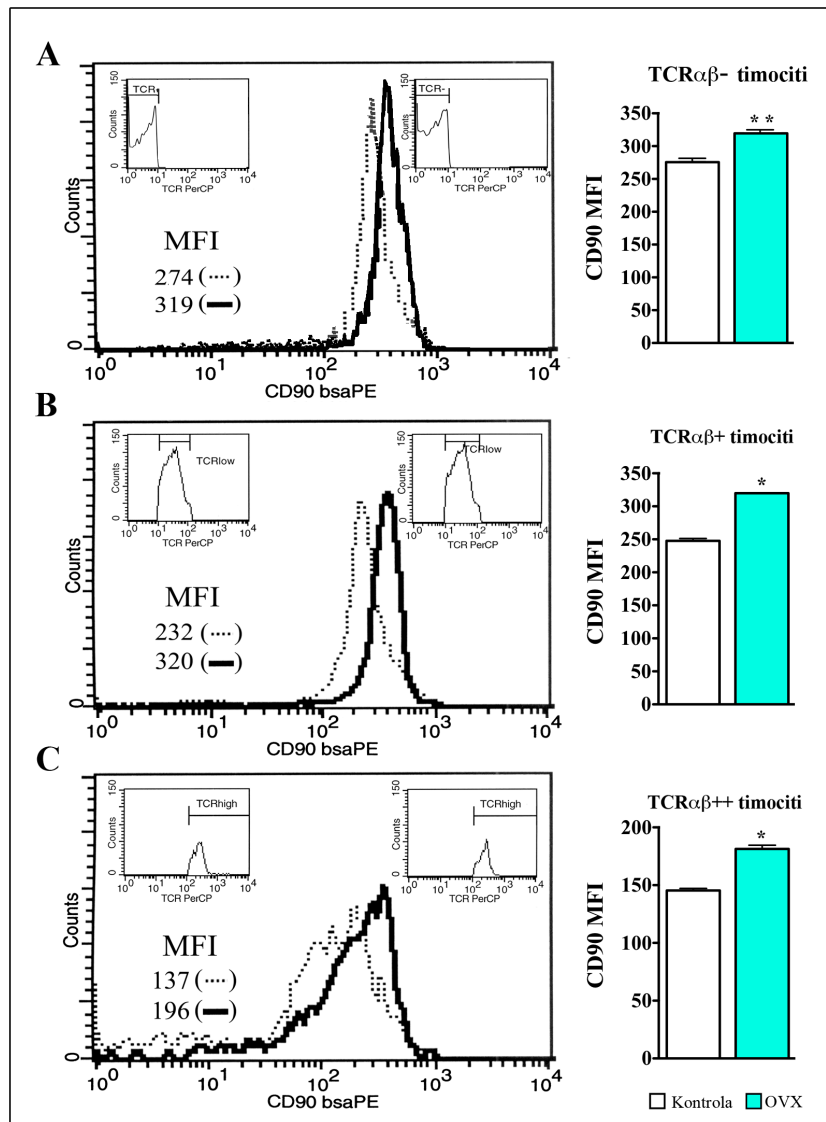


**Slika 35. Uticaj ovarijektomije na procenat i ukupan broj ćelija u subpopulacijama CD4-CD8- TCR $\alpha\beta$ - timocita razdvojenim na osnovu ekspresije CD2 i CD45RC molekula.**

Histogrami predstavljaju (levo) procenat i (desno) ukupan broj CD45RC+CD2-, CD45RC+CD2+ i CD45RC-CD2+ timocita u populaciji CD4-CD8- TCR $\alpha\beta$ - timocita kod ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.2.7.3. Ekspresija CD90

Analiza ekspresije CD90 molekula pokazala je da je uklanjanje jajnika dovelo do značajnog ( $p < 0.01$ ) povećanja procenta CD90+ ćelija u suspenziji timocita ovarijektomisanih ( $95.65 \% \pm 0.57 \%$ ) u odnosu na kontrolne ( $97.97 \% \pm 0.01 \%$ ) životinje istog uzrasta. Analiza MFI za CD90 na ovim ćelijama pokazala je porast ( $p < 0.05$ ) površinske gustine ekspresije CD90 molekula u ukupnoj populaciji timocita kod ovarijektomisanih ( $311 \pm 1.9$ ) u odnosu na kontrolne životinje ( $249 \pm 4.8$ ). Vrednost MFI za CD90 značajno ( $p < 0.01$ ) je povećana i u populaciji TCR $\alpha\beta$ - timocita koju uglavnom sačinjavaju DP timociti koji su „prošli“ kroz proces  $\beta$ -selekcije, kao i u populaciji TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ) timocita koji uglavnom predstavljaju ćelije koje ulaze u proces selekcije kod ovarijektomisanih u poređenju sa kontrolnim životinjama. Pored toga, kod ovarijektomisanih životinja vrednost MFI za CD90 povećana ( $p < 0.05$ ) je i na najzrelijim TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocitima, koje uglavnom sačinjavaju medularni DP timociti koji su „prošli“ pozitivnu selekciju kao i zrele JP ćelije, u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 36).

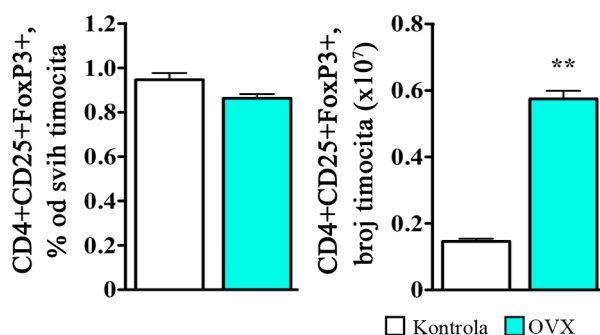


**Slika 36. Uticaj ovarijektomije na ekspresiju CD90 molekula na timocitima.**

Protočno-fluorocitometrijski profili prikazuju ekspresiju CD90 molekula kao i odgovarajuće vrednosti srednjeg intenziteta fluorescence (MFI) koji emituje fluorohrom vezan za antitelo specifično za CD90 u populacijama timocita koji ispoljavaju: (A) nedetektabilan nivo ekspresije TCR $\alpha\beta^-$ , (B) nizak TCR $\alpha\beta^+$  i (C) visok nivo TCR $\alpha\beta^{++}$  izolovanih iz (široka linija) ovarijektomisanih (OVX) i (tanka linija) kontrolnih životinja (Kontrola). Razdvajanje timocita na osnovu ekspresije TCR $\alpha\beta$  učinjeno je kao što je prikazano u umetnutim histogramima u levom (Kontrola) i desnom uglu (OVX). Stubičasti histogrami predstavljaju MFI vrednosti za populaciju (A) TCR $\alpha\beta^-$ , (B) TCR $\alpha\beta^+$  i (C) TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita izolovanih iz OVX i Kontrolnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \* $p < 0.05$ .

#### 4.2.7.4. Čelije $CD4+CD25+FoxP3+$ fenotipa

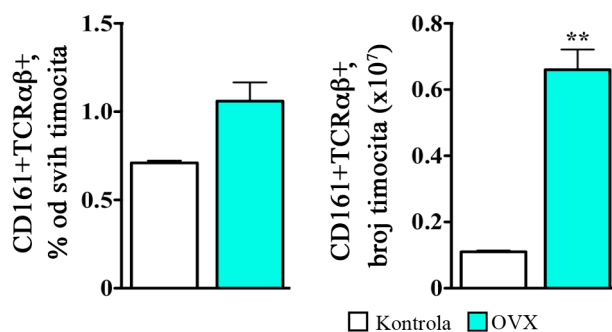
Ovarijskomija nije uticala na procentualnu zastupljenost  $CD4+CD25+FoxP3+$  ćelija u suspenzijama timocita, ali je dovela do značajnog ( $p<0.01$ ) povećanja ukupnog broja ovih ćelija u timusu u odnosu na kontrolne životinje istog uzrasta (Slika 37).



**Slika 37. Uticaj ovarijskomije na procenat i ukupan broj  $CD4+CD25+FoxP3+$  ćelija u timusu.** Histogrami predstavljaju procenat (levo) i ukupan broj (desno)  $CD4+CD25+FoxP3+$  ćelija u timusu ovarijskomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M.; ( $n\geq 6$ );\*\* $p<0.01$ .

#### 4.2.7.5. Čelije $CD161+TCR\alpha\beta+$ fenotipa

Procenat NKT ćelija u suspenziji timocita nije promenjen nakon uklanjanja hormona jajnika, ali je usled povećanja ukupne celularnosti organa, nakon ovarijskomije, došlo do povećanja ( $p<0.01$ ) ukupnog broja ovih ćelija u timusu u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 38).



**Slika 38. Uticaj ovarijskomije na procenat i ukupan broj  $CD161+TCR\alpha\beta+$  ćelija u timusu.** Histogrami predstavljaju procenat (levo) i ukupan broj (desno)  $CD161+TCR\alpha\beta+$  ćelija u timusu ovarijskomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M.; ( $n\geq 6$ );\*\* $p<0.01$ .

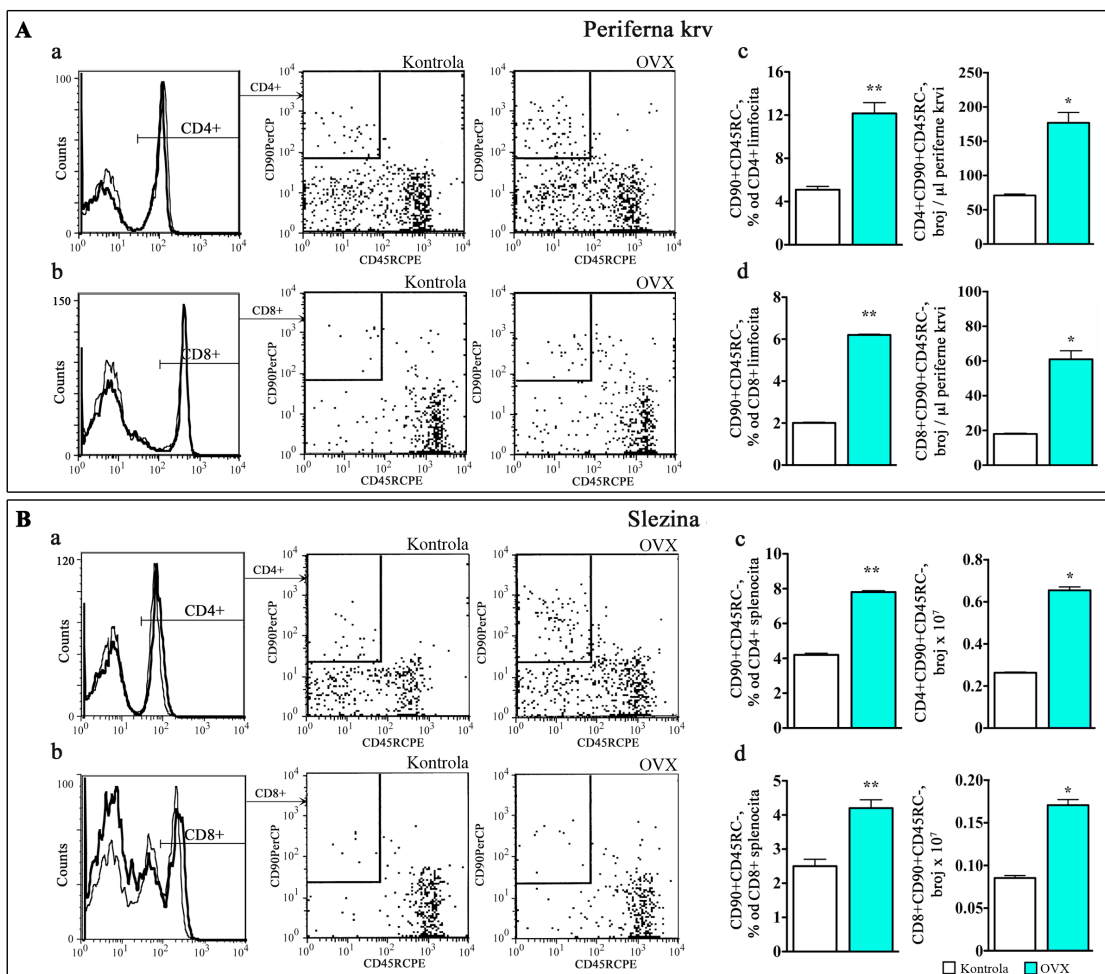
#### ***4.2.8. Uticaj ovarijektomije na sveže timusne emigrante, konvencionalne i regulatorne T-limfocite u perifernoj krvi i slezini***

##### ***4.2.8.1. Sveži timusni emigranti***

Uklanjanje hormona jajnika dovelo je do značajnog povećanja procenta ( $p < 0.01$ ) svežih timusnih emigranata u populaciji CD4+ i CD8+ limfocita periferne krvi i slezine kao i povećanja ( $p < 0.05$ ) ukupnog broja CD4+ i CD8+ svežih timusnih emigranata u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 39).

Izraženije povećanje ukupnog broja CD8+ svežih timusnih emigranata u odnosu na CD4+ sveže timusne emigrante, dovelo je do značajnog ( $p < 0.01$ ) smanjenja odnosa procentualne zastupljenosti CD4+ svežih timusnih emigranata i CD8+ svežih timusnih emigranata u perifernoj krvi ovarijektomisanih ( $2.91 \pm 0.04$ ) u odnosu na kontrolne životinje ( $3.99 \pm 0.06$ ). Za razliku od periferne krvi, u slezini ovih životinja povećanje ukupnog broja svežih timusnih emigranata CD4+ fenotipa bilo je izraženije, pa je došlo do značajnog ( $p < 0.05$ ) povećanja odnosa procentualne zastupljenosti CD4+ svežih timusnih emigranata : CD8+ svežih timusnih emigranata kod ovarijektomisanih ( $3.88 \pm 0.23$ ) u odnosu na kontrole ( $3.06 \pm 0.16$ ).





Slika 39. Uticaj ovarijektomije na sveže timusne emigrante u perifernoj krvi i slezini.

Reprezentativni tačkasti protočno-fluorocitometrijski profili prikazuju izdvajanje populacije svežih timusnih emigranata (CD90+CD45RC-) na osnovu ekspresije CD90 i CD45RC molekula u populaciji CD4+ (a) i CD8+ (b) limfocita (A) perifernoj krvi i (B) slezini kod ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). (a) CD4+ i (b) CD8+ limfociti (A) perifernoj krvi i (B) slezini kod OVX (debeli linija) i kontrolnih životinja (tanka linija) su izdvojeni kao što je prikazano na preklapljenim protočno-fluorocitometrijskim histogramima.

Histogrami predstavljaju (levo) procenat i (desno) ukupan broj CD90+CD45RC- ćelija u populaciji (c) CD4+ i (d) CD8+ limfocita (A) perifernoj krvi i (B) slezini kod OVX i kontrolnih životinja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M.; (n≥6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

#### 4.2.8.2. *TCR $\alpha\beta$ +*, *CD4+* i *CD8+* T-limfociti

Uklanjanje hormona jajnika nije uticalo na procenat i ukupan broj TCR $\alpha\beta$ + limfocita u perifernoj krvi. Međutim, u slezini ovarijektomisanih ženki pacova došlo je do značajnog ( $p < 0.01$ ) smanjenja procenta, a povećanja ( $p < 0.05$ ) ukupnog broja T-limfocita u poređenju sa kontrolama (Tabela 6).

Ni u jednom od analiziranih limfoidnih odeljaka nisu detektovane značajne promene u zastupljenosti CD4+ i CD8+ ćelija unutar populacije TCR $\alpha\beta$ + limfocita (Tabela 6). Ukupan broj CD4+ i CD8+ T-limfocita u perifernoj krvi je takođe ostao nepromenjen, dok je ukupan broj ovih ćelija u slezini ovarijektomisanih životinja bio značajno ( $p < 0.05$ ) viši nego kod kontrolnih životinja. Kako je povećanje ukupnog broja CD4+TCR $\alpha\beta$ + splenocita bilo izraženije od porasta ukupnog broja CD8+TCR $\alpha\beta$ + splenocita, odnos procentualne zastupljenosti CD4+TCR $\alpha\beta$ + : CD8+TCR $\alpha\beta$ + splenocita značajno ( $p < 0.05$ ) je porastao kod ovarijektomisanih ( $2.35 \pm 0.06$ ) u odnosu na kontrolne životinje ( $1.90 \pm 0.05$ ).

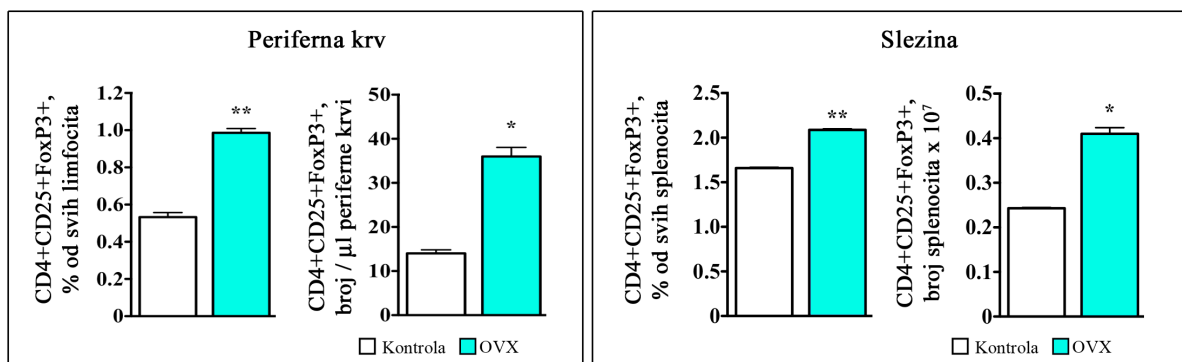
**Tabela 6. Procenat TCR $\alpha\beta$ + limfocita u perifernoj krvi i slezini, procenti CD4+ i CD8+ ćelija u populaciji TCR $\alpha\beta$ + limfocita i ukupan broj ovih ćelija u perifernoj krvi i slezini ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih ženki pacova (Kontrola).**

|  | Kontrola         | OVX                |
|--|------------------|--------------------|
| <b>Procenat (%)</b>                                      |                  |                    |
| TCR $\alpha\beta$ + limfocita                            | 74.36 $\pm$ 1.14 | 68.01 $\pm$ 1.55   |
| CD4+ od TCR $\alpha\beta$ + limfocita                    | 60.79 $\pm$ 0.39 | 62.43 $\pm$ 0.65   |
| CD8+ od TCR $\alpha\beta$ + limfocita                    | 37.53 $\pm$ 0.47 | 36.56 $\pm$ 0.24   |
| <b>Broj limfocita / <math>\mu</math>l periferne krvi</b> |                  |                    |
| TCR $\alpha\beta$ +                                      | 2109 $\pm$ 208   | 2420 $\pm$ 279     |
| CD4+ TCR $\alpha\beta$ +                                 | 1277 $\pm$ 116   | 1456 $\pm$ 214     |
| CD8+ TCR $\alpha\beta$ +                                 | 798 $\pm$ 90     | 836 $\pm$ 148      |
| <b>Procenat (%)</b>                                      |                  |                    |
| TCR $\alpha\beta$ + splenocita                           | 64.45 $\pm$ 0.46 | 59.93 $\pm$ 1.16** |
| CD4+ od TCR $\alpha\beta$ + splenocita                   | 54.33 $\pm$ 5.60 | 65.50 $\pm$ 1.16   |
| CD8+ od TCR $\alpha\beta$ + splenocita                   | 32.34 $\pm$ 0.64 | 29.58 $\pm$ 1.00   |
| <b>Broj splenocita x 10<sup>7</sup></b>                  |                  |                    |
| TCR $\alpha\beta$ +                                      | 9.45 $\pm$ 0.21  | 11.75 $\pm$ 0.76*  |
| CD4+ TCR $\alpha\beta$ +                                 | 5.95 $\pm$ 0.18  | 8.40 $\pm$ 0.84*   |
| CD8+ TCR $\alpha\beta$ +                                 | 3.08 $\pm$ 0.06  | 3.63 $\pm$ 0.25*   |

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M.; (n $\geq$ 6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

#### **4.2.8.3. Ćelije CD4+CD25+FoxP3+ fenotipa**

Uklanjanje jajnika u uzrastu od 10 meseci dovelo je do značajnog (p<0.05) povećanja procenta i ukupnog broja CD4+CD25+FoxP3+ limfocita u oba ispitivana limfoidna odeljka (Slika 40).

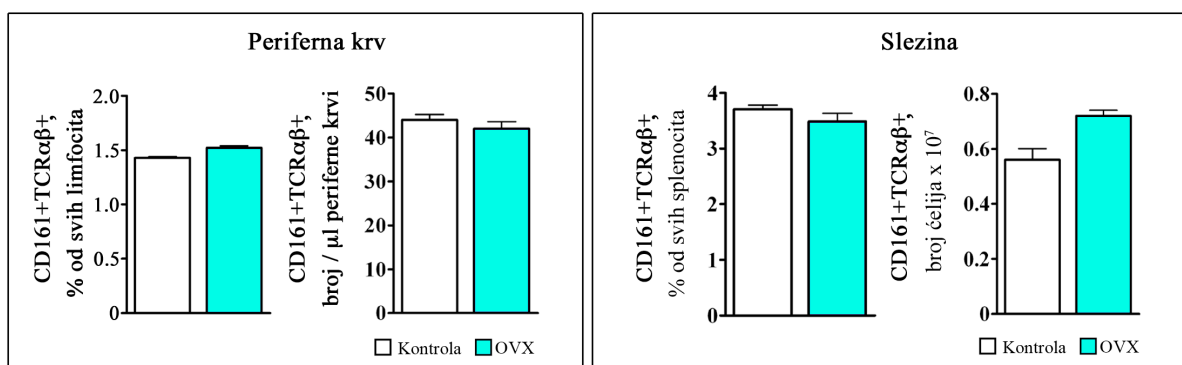


**Slika 40. Uticaj ovarijektomije na procenat i broj CD4+CD25+FoxP3+ limfocita u perifernoj krvi i slezini.**

Histogrami predstavljaju (levo) procenat i (desno) ukupan broj CD4+CD25+FoxP3+ limfocita u perifernoj krvi i slezini ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M.; (n $\geq$ 6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

#### 4.2.8.4. Ćelije CD161+TCR $\alpha\beta$ + fenotipa

Uklanjanje hormona jajnika nije uticalo na procentualnu zastupljenost i ukupan broj NKT ćelija u perifernoj krvi i slezini (Slika 41).



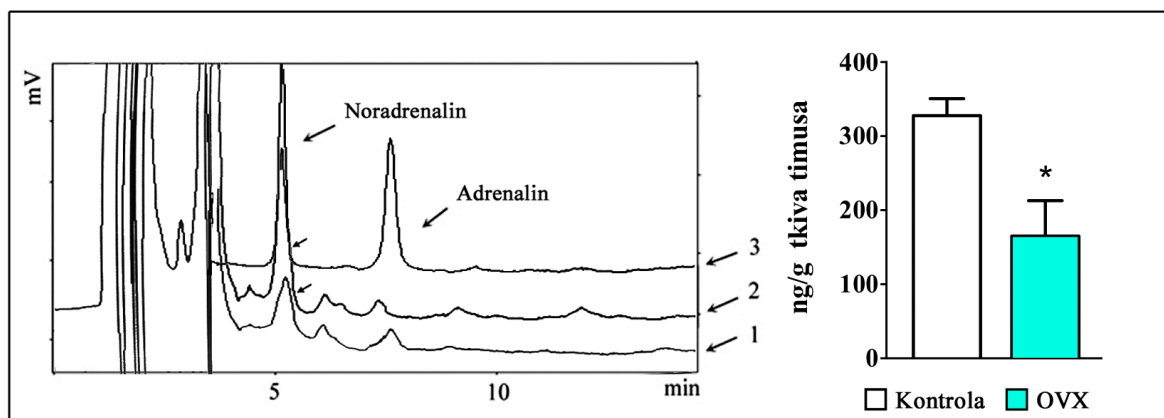
**Slika 41. Ovarijektomija nije uticala na procenat i ukupan broj CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u perifernoj krvi i slezini.**

Histogrami predstavljaju (levo) procenat i (desno) ukupan broj CD161+TCR $\alpha\beta$ + limfocita u perifernoj krvi i slezini ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M.; (n $\geq$ 6).

#### 4.2.9. Uticaj ovarijektomije na koncentraciju kateholamina u timusu i ekspresiju adrenergičkih receptora na timocitima

##### 4.2.9.1. Koncentracija kateholamina u timusu

Analiza ekstrakta timusnog tkiva HPLC metodom pokazala je da je 30. dana nakon uklanjanja jajnika koncentracija noradrenalina u timusu 11 meseci starih ženki pacova bila značajno ( $p < 0.05$ ) niža nego kod kontrolnih životinja istog uzrasta. (Slika 42). Prosečna vrednost koncentracije noradrenalina kod ovarijektomisanih životinja bila je približno 43% niža od prosečne vrednosti noradrenalina kod kontrolnih životinja. Kao i u timusu 3 meseca starih ženki pacova, adrenalin se ili nije mogao detektovati, ili je bio prisutan u veoma niskim koncentracijama koje nisu dozvoljavale pouzdanu kvantifikaciju (Slika 42).

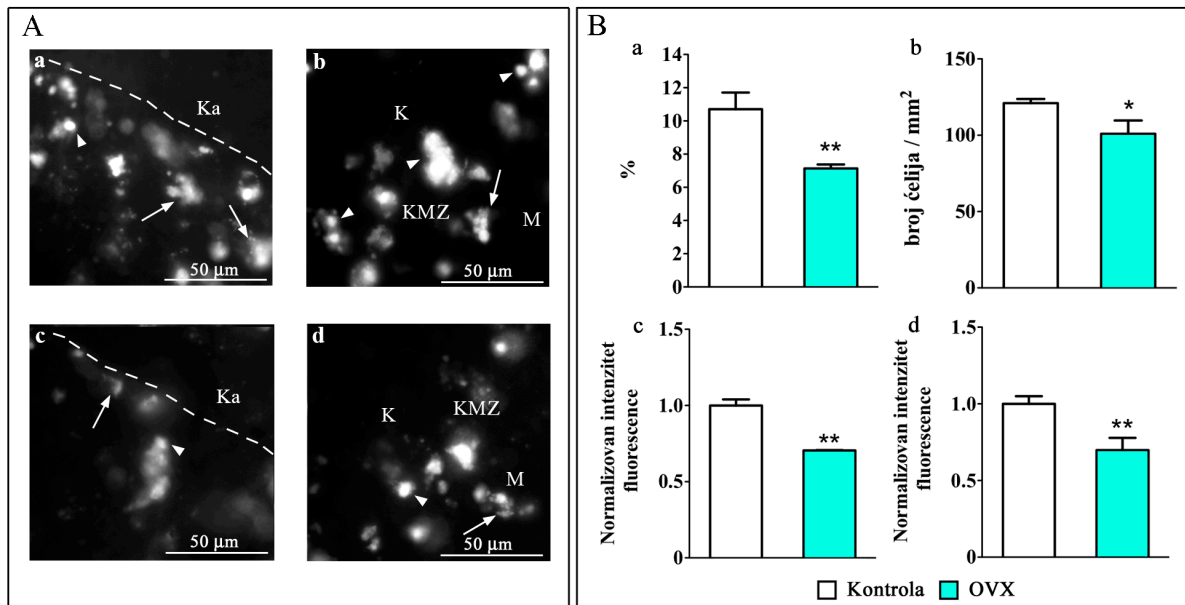


**Slika 42. Uticaj ovarijektomije na koncentraciju kateholamina u timusu.**

Hromatogrami reprezentativnih uzoraka timusa (hromatogram 1) 11 meseci starih pacova kojima su jajnici uklonjeni u uzrastu od 10 meseci, (hromatogram 2) kontrolnih životinja istog uzrasta, i (hromatogram 3) smeše standarda koja sadrži: 100 ng/ml noradrenalina i 100 ng/ml adrenalina rastvorenog u 0.4 M rastvoru perhorne kiseline. Pikovi koji odgovaraju noradrenalinu i adrenalinu označeni su strelicama. Stubičasti histogram prikazuje koncentraciju noradrenalina u timusu 11 meseci starih pacova kojima su jajnici uklonjeni u uzrastu od 10 meseci (OVX) i kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M.; ( $n \geq 6$ ); \* $p < 0.05$ .

#### 4.2.9.2. *Kateholaminska nervna vlakna u timusu*

Nakon primene metode za pobuđivanje tkivne fluorescence na presecima timusa 11 meseci starih ženki pacova pokazana je slična topografija fluorescentnih nervnih vlakana kao i kod 3 meseca starih ženki pacova. Fluorescentna nervna vlakna su uočena, većinom, u kapsuli i septama, u subkapsularnom odeljku timusa kao i u KMZ, a samo veoma retka fluorescentna nervna vlakna su uočena u parenhimu medule i korteksa (Slika 43). Značajnije razlike u distribuciji kateholaminskih nervnih profila nisu zapažene ni na presecima timusa ovarijektomisanih u odnosu na kontrolne životinje istog uzrasta. Međutim, merenjem procentualne zastupljenosti nervnih profila i intenziteta fluorescentnog signala koji su emitovale ova vlakna nakon tretmana SPG rastvorom, pokazana je značajno ( $p < 0.01$ ) manja procentualna zastupljenost i niži ( $p < 0.05$ ) intenzitet fluorescentnog signala kateholaminskih vlakana na presecima timusa ovarijektomisanih u odnosu na kontrolne životinje. Pored toga, u odnosu na kontrolne životinje, na presecima timusa ovarijektomisanih životinja, pokazano je smanjenje ( $p < 0.01$ ) površinske gustine autofluorescentnih ćelija i intenziteta fluorescentnog signala koji emituju ove ćelije (TEC, makrofage i mastociti), locirane uglavnom u KMZ. Na presecima timusa, koji su tretirani mineralnim uljem umesto SPG rastvorom, ovarijektomisanih i kontrolnih životinja nije uočena značajna razlika u broju autofluorescentnih ćelija, kao ni u intenzitetu njihove autofluorescence.



**Slika 43. Uticaj ovarijektomije na distribuciju, gustinu i intenzitet fluorescence kateholaminskih vlakana i autofluorescentnih ćelija u timusu.**

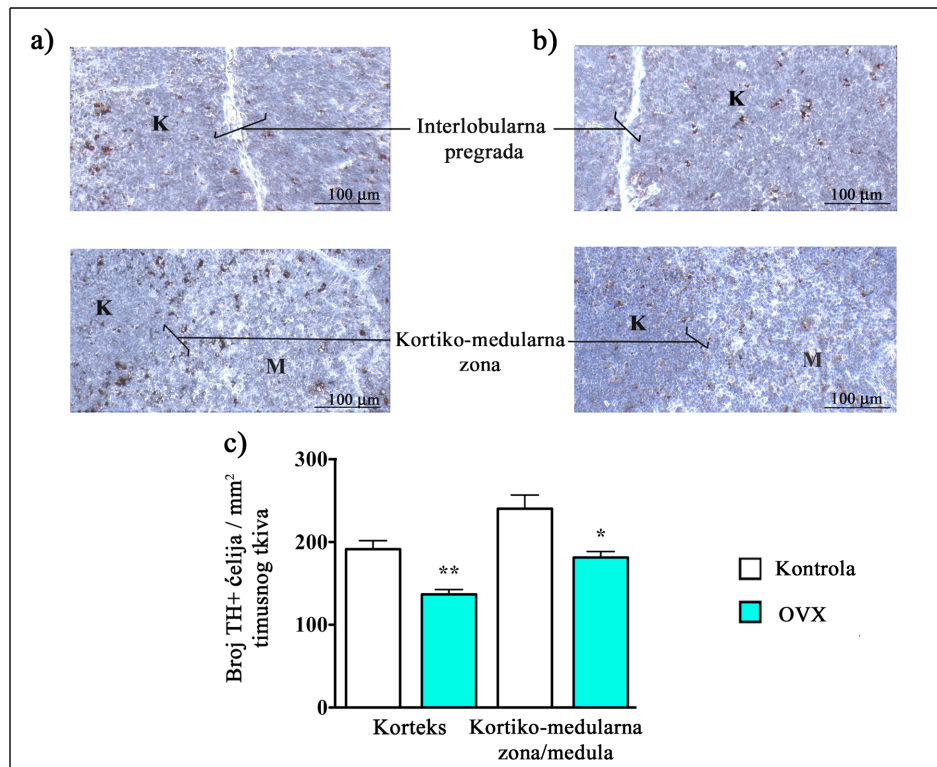
(A) Kateholaminska nervna vlakna i autofluorescentne ćelije vizualizovane metodom za pobuđivanje tkivne fluorescence (SPG metoda). Reprezentativne fotomikrografije preseka timusa prikazuju fluorescentne nervne profile u (a, c) kortikalnom (b, d) kortiko-medularnom/medularnom odeljku timusa 11 meseci starih pacova kojima su jajnici uklonjeni u uzrastu od 10 meseci (c, d) i kontrolnih životinja istog uzrasta (a, b). Strelice prikazuju fluorescentna nervna vlakna, a vrh strelice autofluorescentne ćelije. Ka, kapsula; Uveličanje x 40, K, korteks; KMZ, kortiko-medularna zona; M, medula.

(B) Histogrami prikazuju (a) procentualnu zastupljenost fluorescentnih nervnih vlakana (procenat analizirane površine koju pokrivaju fluorescentna nervna vlakna), (b) gustinu autofluorescentnih ćelija (broj ćelija /mm<sup>2</sup> preseka timusa), digitalno kvantifikovan intenzitet fluorescentnog signala koji emituju (c) nervna vlakna i (d) autofluorescentne ćelije na presecima tkiva timusa 11 meseci starih pacova kojima su jajnici uklonjeni u uzrastu od 10 meseci (OVX) i kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M.; (n≥6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

#### ***4.2.9.3. Čelije koje sintetišu kateholamine u timusu***

Na presecima timusa 11 meseci starih ženki najveća gustina ćelija koje sintetišu kateholamine (TH+ ćelija) zapažena je na medularnoj strani KMZ i u subkapsularnom/subseptalnom regionu. Samo retke TH+ ćelije zapažene su intrakortikalno i medularno. Na presecima timusa životinja kojima su uklonjeni jajnici, pokazano je značajno smanjenje zastupljenosti limfoidnih i nelimfoidnih ćelija koje eksprimiraju TH u subkapsularnom/subseptalnom regionu ( $p < 0.01$ ), kao i na medularnoj strani KMZ i u meduli ( $p < 0.05$ ) (Slika 44).



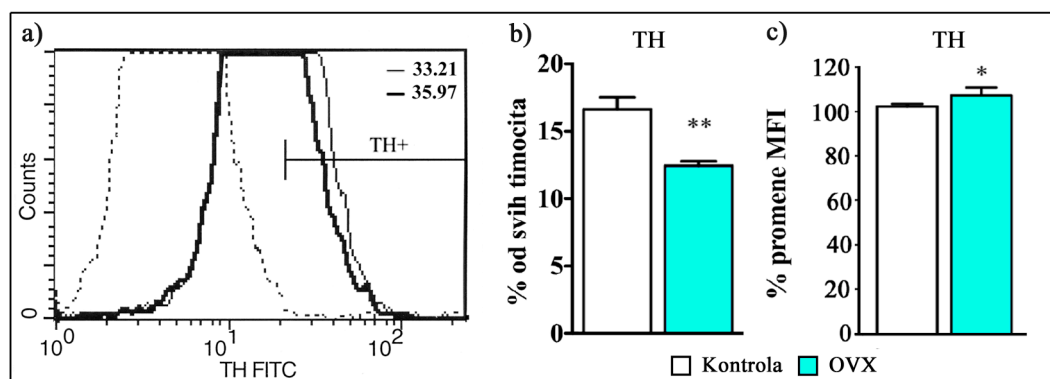


**Slika 44. Uticaj ovarijektomije na distribuciju i gustinu ćelija koje ispoljavaju tirozin hidrosilazu u timusu.**

(A) Reprezentativne fotomikrografije timusnih preseka (a) 11 meseci starih životinja kojima su uklonjeni jajnici (OVX) i (b) kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola) bojenih imunohistochemijskom metodom korišćenjem monoklonskih antitela specifičnih za tirozin hidrosilazu (TH). Uveličanje x10. K, korteks; M, medula;

(B) Na histogramu je prikazana gustina (broj ćelija /mm<sup>2</sup> preseka timusa) TH+ limfoidnih i nelimfoidnih ćelija u korteksu i kortiko-medularnom/medularnom odeljku timusa odraslih OVX i kontrolnih životinja istog uzrasta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. (n≥6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

Korišćenjem protočno-fluorocitometrijske metode pokazano je da je procenat TH+ timocita bio značajno (p<0.01) manji u suspenziji timocita ovarijektomisanih u odnosu na kontrolne životinje (Slika 45), što je u skladu sa prethodnim nalazom. Međutim, analiza MFI za TH pokazala je da je u timocitima ovarijektomisanih životinja došlo do značajnog (p<0.05) povećanja gustine zastupljenosti ovog enzima u odnosu na timocite kontrolnih životinja.



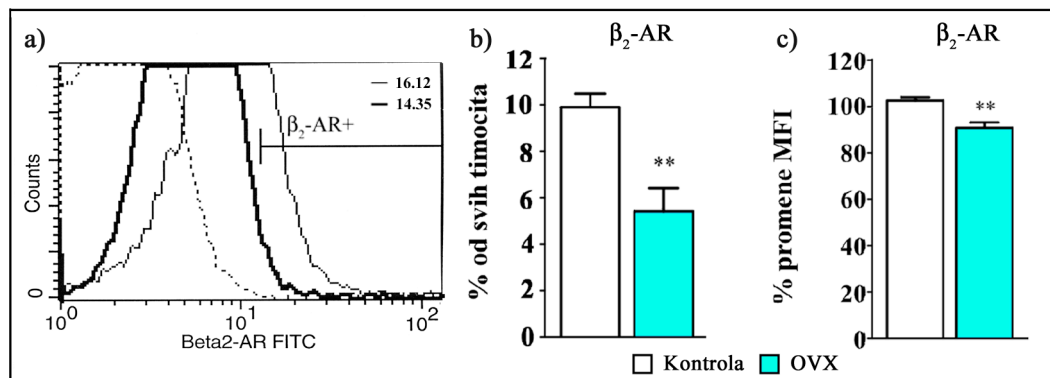
**Slika 45. Uticaj ovarijektomije na ekspresiju tirozin hidroksilaze u timocitima.**

(a) Reprezentativni protočno-fluorocitometrijski profili prikazuju ekspresiju tirozin hidroksilaze (TH) kao i odgovarajuće vrednosti srednjeg intenziteta fluorescence (MFI) u suspenziji timocita (široka linija) ovarijektomisanih i (tanka linija) kontrolnih životinja. Isprekidana linija označava izotipsku kontrolu.

Stubičasti histogrami predstavljaju (b) procenat TH<sup>+</sup> ćelija i (c) promenu MFI koju emituje fluorohrom vezan za monoklonsko antitelo specifično za TH u suspenziji timocita 11 meseci starih ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. (n≥6); \*p<0.05; \*\*p<0.01.

#### 4.2.9.4. Ekspresija $\beta_2$ -adrenergičkih receptora

U suspenziji timocita ovarijektomisanih životinja pokazano je značajno ( $p<0.01$ ) smanjenje procentualne zastupljenosti  $\beta_2$ -AR<sup>+</sup> ćelija, kao i, sudeći prema MFI za  $\beta_2$ -AR, smanjenje ( $p<0.01$ ) gustine zastupljenosti  $\beta_2$ -AR na membrani timocita u odnosu na kontrolne životinje (Slika 46).



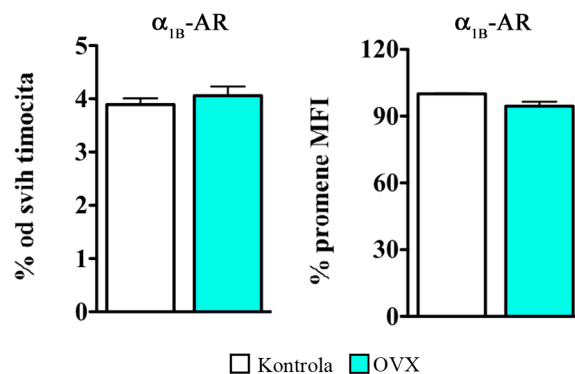
**Slika 46. Uticaj ovarijektomije na ekspresiju  $\beta_2$ -adrenergičkih receptora na timocitima**

(a) Reprezentativni protočno-fluorocitometrijski prikazi ekspresije  $\beta_2$ -adrenergičkih receptora ( $\beta_2$ -AR) kao i odgovarajuće vrednosti srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI) u suspenziji timocita (široka linija) ovarijektomisanih i (tanka linija) kontrolnih životinja istog uzrasta. Isprekidanom linijom označena je izotipska kontrola.

Stubičasti histogrami predstavljaju (b) procenat  $\beta_2$ -AR+ ćelija i (c) promenu MFI koji emituje fluorohrom vezan za antitelo specifično za  $\beta_2$ -AR u suspenziji timocita 11 meseci starih ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja istog uzrasta (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ); \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.2.9.5. Ekspresija $\alpha_{1B}$ -adrenergičkih receptora

Analizom ekspresije  $\alpha_{1B}$ -AR u suspenzijama timocita ovarijektomisanih životinja nije zabeležena statistički značajna razlika u procentualnoj zastupljenosti timocita koji ispoljavaju  $\alpha_{1B}$ -AR, kao ni razlika u gustini ekspresije za  $\alpha_{1B}$ -AR na  $\alpha_{1B}$ -AR+ timocitima u odnosu na kontrolne životinje istog uzrasta (Slika 47).



**Slika 47. Ovarijektomija nije uticala na ekspresiju  $\alpha_{1B}$ -adrenergičkih receptora na timocitima.**

Stubičasti histogrami predstavljaju (levo) procenat  $\alpha_{1B}$ -AR+ ćelija i (desno) promenu vrednosti srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI) koji emituje fluorohrom vezan za antitelo specifično za  $\alpha_{1B}$ -AR u suspenziji timocita ovarijektomisanih (OVX) i kontrolnih životinja (Kontrola). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 6$ ).

---

## **5. DISKUSIJA**

### **5.1. Neonatalna androgenizacija**

#### **5.1.1. Uticaj neonatalne androgenizacije na masu i celularnost timusa**

Kod intaktnih ženki pacova, timus dostiže maksimalnu težinu i celularnost oko 40. postnatalnog dana, a nakon toga, masa timusa i ukupan broj timocita postepeno se smanjuju (Shanker, 2004). Jednokratno davanje testosterona u kritičnom postnatalnom periodu (kasni prenatalni period i prvih 10 dana postnatalno) dovelo je do povećanja mase timusa i ukupnog broja timocita kod 3 meseca starih ženki pacova. Imajući u vidu da je ovaj tretman (neonatalna androgenizacija) kod ženki pacova istog soja doveo do smanjenja mase timusa i ukupnog broja timocita 30. postnatalnog dana, a da je 60. postnatalnog dana vrednost ovih parametara bila ista kao kod kontrolnih životinja (Leposavić i sar., 2005b), može se zaključiti da jednokratno ubrizgavanje testosterona tokom kritičnog neonatalnog perioda usporava postnatalni rast timusa i odlaže njegovu involuciju.

Značajno povećanje mase timusa, kao i ukupnog broja timocita, kod neonatalno androgenizovanih ženki pacova u odnosu na kontrolne životinje moguće je objasniti smanjenom apoptozom, a povećanom proliferacijom timocita. Naime, na presecima timusa androgenizovanih životinja, uočeno je značajno smanjenje gustine apoptotičnih timocita koji su pokazivali membransko bojenje aneksinom V. Pored timocita, na presecima timusa bojenim aneksinom V konjugovanim sa FITC uočene su i ćelije sa intracitoplazmatskim bojenjem ovom fluorescentnom bojom. Na osnovu lokalizacije ovih ćelija, njihove veličine i morfologije nameće se zaključak da one pripadaju makrofagama (Inaba i sar., 1988; Surh i Sprent, 1994) i TNC (Cao i sar., 2004), koje su fagocitovale apoptotične timocite. Na presecima timusa neonatalno androgenizovanih životinja bila je smanjena i gustina ovih ćelija, što takođe ide u prilog prethodnoj tvrdnji. Istu tvrdnju podržava i smanjena procentualna zastupljenost apoptotičnih ćelija u 18-časovnoj kulturi timocita izolovanih iz timusa neonatalno androgenizovanih ženki pacova.

U suspenzijama timocita sveže izolovanih iz timusa neonatalno androgenizovanih životinja značajno je bio povećan procenat proliferišućih timocita, što

bi ukazivalo na povećanu proliferaciju ovih ćelija u timusu. U prilog ovome išli bi nalazi dobijeni u kulturi timocita izolovanih iz neonatalno androgenizovanih životinja, koji pokazuju značajno veći procenat proliferišućih ćelija, kako u odsustvu tako i u prisustvu ConA.

Na prvi pogled, promene u apoptozi i proliferaciji timocita kod neonatalno androgenizovanih životinja deluju neočekivano s obzirom na visoku koncentraciju estradiola u serumu ovih životinja. Naime, pokazano je da davanje visokih doza estradiola dovodi do atrofije timusa kod miševa oba pola (Erlandsson i sar., 2001). Ovi nalazi se mogu povezati sa podacima da davanje visokih doza estradiola povećava apoptozu (Hoffman-Goetz i sar., 2001; Mor i sar., 2001; Okasha i sar., 2001; Yao i Hou, 2004; Wang i sar., 2008) i smanjuje proliferaciju timocita kod miša (Gulino i sar., 1985; Okuyama i sar., 1992; Gould i sar., 2000; Zoller i Kersh, 2006). Međutim, ako se uzme u obzir da je ekspresija klasičnog intracelularnog ER $\alpha$  smanjena u timocitima neonatalno androgenizovanih životinja, smanjenje apoptoze i povećanje proliferacije timocita kod ovih životinja mogli bi se objasniti smanjenom osetljivošću ER na delovanje estrogena. U prilog ovoj pretpostavci mogu se navesti nalazi drugih autora da je kod neonatalno androgenizovanih ženki značajno smanjena osetljivost ER na delovanje estrogena u ćelijama nervnog tkiva, jetre, uterusu i masnog tkiva (Gerall i Kenney, 1970; Whalen i Luttge, 1971; Gerall i sar., 1972; Lobl, 1975; Watanobe i Habu, 2003). Smanjenje ekspresije ER $\alpha$  u timocitima, koje bi posledično moglo da dovede i do smanjene osetljivosti ovih ćelija na delovanje estrogena, mogli bi se objasniti fenomenom „pogrešnog“ hormonskog programiranja (engl. misprinting). Hormonsko programiranje (engl. hormonal imprinting), podrazumeva da kontakt hormona/neurotransmitera u odgovarajućoj koncentraciji, sa specifičnim receptorom, tokom kritičnog neonatalnog perioda, trajno određuje kapacitet receptora za vezivanje liganda i prenos signala u ćeliju (Csaba i sar., 1988; Csaba i Inczeffi-Gonda, 2002). Sa druge strane, prisustvo nekog hormona/neurotransmitera, ili tom hormonu/neurotransmitteru srodnih molekula, u neadekvatnoj koncentraciji (smanjenoj ili povećanoj) u kritičnom neonatalnom periodu dovodi do „pogrešnog“ programiranja, odnosno trajno menja kapacitet receptora za vezivanje liganda i/ili efikasnost prenosa signala u ćeliju (Csaba i sar., 1988; Csaba i Inczeffi-Gonda, 2002). Pokazano je : 1) da timus sadrži citohrom P-450 enzime koji učestvuju u aromatizaciji testosterona i

njegovoj konverziji u estrogen (Martin, 2000; Thangavel i sar., 2007) i 2) da su ER prisutni u ćelijama timusa u kritičnom neonatalnom uzrastu (de Fougérolles Nunn i sar., 1999). Shodno tome, može se pretpostaviti da je povećana koncentracija testosterona (iz koga aromatizacijom nastaje estrogen) u kritičnom neonatalnom uzrastu dovela do trajnog smanjenja ekspresije ER u timocitima, i posledično smanjene osetljivosti ovih ćelija na delovanje estrogena. Nalaz smanjene apoptoze i povećane proliferacije timocita kod neonatalno androgenizovanih životinja mogao bi se objasniti i nalazima koji ukazuju da neonatalna androgenizacija dovodi do dramatičnog povećanja nivoa serumskog  $\alpha_2u$ -globulina (Mertens i Verhoeven, 1985), koji vezuje serumske polne steroide (pre svega testosteron i estrogen), i posledično menja koncentraciju slobodnih, biološki aktivnih oblika ovih hormona u cirkulaciji. Osim toga, budući da je pokazano da je progesteron neophodan za potpuno ispoljavanje efekata estrogena na involuciju timusa (Tibbetts i sar., 1999), oslabljeno delovanje progesterona, usled smanjene koncentracije u serumu neonatalno androgenizovanih životinja, moglo bi takođe da doprinese povećanju ukupnog broja timocita kod neonatalno androgenizovanih životinja. Ova mogućnost izgleda naročito verovatno u svetlu činjenice da je ispoljavanje PR moguće samo u uslovima optimalnog delovanja estrogena (Uotinen i sar., 1999).

### **5.1.2. Uticaj neonatalne androgenizacije na sazrevanje T-ćelija**

Prethodno izneti rezultati ukazuju da je neonatalna androgenizacija dovela do značajnog povećanja ukupnog broja timocita menjajući njihovu apoptozu i proliferaciju. Budući da su ova dva procesa tesno povezana sa procesom diferencijacije/sazrevanja timocita, nametnula se potreba ispitivanja ekspresije markera diferencijacije timocita (CD2, CD45RC, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ ) kod neonatalno androgenizovanih i kontrolnih ženki pacova.

Kod neonatalno androgenizovanih životinja procenat najnezrelijih CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - timocita i CD4+CD8+ TCR $\alpha\beta$ - timocita, za koje se smatra da predstavljaju ćelije koje su „prošle“  $\beta$ -selekciju (Zamoyska i Lovatt, 2004) značajno je smanjen, dok je učešće CD4+CD8+ TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> timocita, za koje se smatra da predstavljaju ćelije koje ulaze u selekzione procese (Zamoyska i Lovatt, 2004), u ukupnoj populaciji timocita nepromenjeno. Ovi podaci, zajedno sa izrazitim povećanjem zastupljenosti timocita koji

su „prošli“ pozitivnu selekciju i dobili signal za preživljavanje i dalju diferencijaciju ( $CD4+CD8+ TCR\alpha\beta^{++}$ ) (Shortman i sar., 1991), kao i ćelija koje nastaju njihovom daljom diferencijacijom,  $CD4-CD8+ TCR\alpha\beta^{++}$  timocita, ukazuju na to da je kod neonatalno androgenizovanih životinja došlo do ubrzanja procesa timopoeze i povećanja zastupljenosti najzrelijih subpopulacija timocita (Šema 1). U svetlu ovih nalaza, nepromenjen broj najnezrelijih  $CD4-CD8-TCR\alpha\beta-$  timocita, i ćelija koje pripadaju najnezrelijim, progenitorskim frakcijama ( $CD2-CD45RC+$  i  $CD2+CD45RC+$  ćelije) ove subpopulacije, sa visokim regenerativni potencijalom (Law i sar., 1989), kod neonatalno androgenizovanih životinja u odnosu na kontrolne životinja ukazuje na kontinualno obnavljanje progenitorskih frakcija kod neonatalno androgenizovanih životinja. Drugim rečima, može se pretpostaviti da je kod neonatalno androgenizovanih životinja, ubrzano sazrevanje progenitorskih ćelija, bilo praćeno njihovim povećanim ulaskom u timus i/ili njihovom povećanom proliferacijom (Šema 1). Povećana proliferacija ćelija sa niskom/nedetektabilnom ekspresijom CD3 molekula ( $CD3-$ ) u kulturi timocita izolovanih iz neonatalno androgenizovanih životinja, u odnosu na timocite izolovane iz kontrolnih životinja, ide u prilog povećane proliferacije progenitorskih ćelija kod neonatalno androgenizovanih životinja. Budući da je pokazano da davanje estradiola, kao i graviditet, dovode do izraženog smanjenja broja prekursora T-ćelija u timusu miša, kao i do smanjenja proliferacije timocita u odgovoru na pre- $TCR\alpha\beta$  signale (Zoller i Kersh, 2006; Zoller i sar., 2007), prethodno navedeni nalazi ukazuju na smanjenu osetljivost najnezrelijih timocita neonatalno androgenizovanih životinja na delovanje estrogena.

Povećanje ukupnog broja ćelija  $CD4+CD8+TCR\alpha\beta-$  fenotipa, koji su „prošli“ proces  $\beta$ -selekcije (Zamoyska i Lovatt, 2004), uz smanjenje njihove zastupljenosti u ukupnoj populaciji timocita, u kontekstu povećanog broja, ali nepromenjenog procenta  $CD4+CD8+TCR\alpha\beta^{+}$  ćelija, koje ulaze u selekzione procese (Zamoyska i Lovatt, 2004), upućuje na efikasniju  $\beta$ -selekciju kod neonatalno androgenizovanih u odnosu na kontrolne životinje (Šema 1). Povećana efikasnost  $\beta$ -selekcije timocita kod neonatalno androgenizovanih životinja u potpunoj je saglasnosti sa smanjenim brojem apoptotičnih ćelija u spoljašnjem korteksu timusa ovih životinja, gde su uglavnom smeštene ćelije koje „prolaze“ kroz ovaj proces (Takahama, 2006). Pored toga, povećana efikasnost  $\beta$ -selekcije takođe je u skladu povećanim procentom proliferišućih timocita koje



ispoljavaju nizak nivo CD3 molekula (CD3<sup>+</sup>) u kulturi timocita izolovanih iz neonatalno androgenizovanih životinja u odnosu na kontrolne životinje. Naime, pokazano je da „prolaskom“ kroz proces  $\beta$ -selekcije timociti, pored signala za preživljavanje i rearanžman  $\alpha$  lanca TCR, dobijaju i signal za proliferaciju (Falk i sar., 1996).

Neizmenjen procenat CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> timocita, koji ulaze u pozitivnu selekciju (Zamoyska i Lovatt, 2004) u suspenzijama timocita neonatalno androgenizovanih životinja, uz povećan procenat CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocita, ćelija koje su „prošle“ pozitivnu selekciju (Shortman i sar., 1991), i najzrelijih, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocita, jasno sugerise efikasniju pozitivnu i/ili manje efikasnu negativnu selekciju i ubrzano sazrevanje ćelija koje su dobile signal za preživljavanje ka ćelijama CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> fenotipa (Šema 1). U prilog efikasnije pozitivne i/ili manje efikasne negativne selekcije timocita kod neonatalno androgenizovanih životinja ide i smanjen broj apoptotičnih timocita u dubokom korteksu i KMZ preseka timusa neonatalno androgenizovanih životinja. Pored toga, smanjenje procentualne zastupljenosti i ukupnog broja ćelija CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCR<sup>+</sup> fenotipa u suspenzijama timocita ovih životinja, takođe podržava prethodnu pretpostavku, budući da je pokazano da CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCR<sup>+</sup> ćelije fenotipski odgovaraju timocitima koji ulaze u apoptozu (Budd i Mixer, 1995).

Imajući u vidu da je pokazano da od nivoa ekspresije Thy-1 molekula zavisi intenzitet signala koji se prenosi posredstvom TCR $\alpha\beta$  i posledično selekcioni „prag“ (Hueber i sar., 1997; Killeen, 1997), gotovo dvostruko povećanje površinske gustine ovog molekula na timocitima koji ulaze u selekzione procese kod neonatalno androgenizovanih životinja išlo bi u prilog efikasnije pozitivne i/ili manje efikasne negativne selekcije kod ovih životinja (Šema 1). Na ovakvu ulogu Thy-1 molekula u selekcionim procesima u timusu ukazuju nalazi dobijeni kod miševa koji ne ispoljavaju ovaj molekul (Thy-1<sup>-/-</sup> miševi) (Hueber i sar., 1997). Naime, pokazano je da kod ovih životinja dolazi do smanjenja pozitivne i izrazitog povećanja negativne selekcije, sa sledstvenim smanjenjem procentualne zastupljenosti i broja najzrelijih timocita (Hueber i sar., 1997). Prema tome, povećana brojnost CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocita, koji su „prošli“ pozitivnu selekciju (Shortman i sar., 1991), kao i brojnost timocita najzrelijeg CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> i CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> fenotipa kod neonatalno androgenizovanih

životinja bi se zaista mogla objasniti efikasnijom pozitivnom i/ili manje efikasnom negativnom selekcijom usled povećane ekspresije Thy-1 molekula na timocitima ovih životinja.

Iako je ukupan broj najzrelijih timocita  $CD4+CD8-TCR\alpha\beta^{++}$  i  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  fenotipa u timusu neonatalno androgenizovanih životinja bio povećan, procentualna zastupljenost  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  timocita bila je povećana, dok je procentualna zastupljenost  $CD4+CD8-TCR\alpha\beta^{++}$  timocita bila smanjena što ukazuje efikasnije linijsko usmeravanje pozitivno selektovanih timocita ka ćelijama  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  fenotipa kod ovih životinja (Šema 1). Nekoliko objašnjenja moglo bi se ponuditi za ovaj nalaz. Prvo, budući da je pokazano da smanjena osetljivost timocita na signale koji se prenose posredstvom pre- $TCR\alpha\beta$  i  $TCR\alpha\beta$  kompleksa, dovodi do povećane zastupljenosti timocita zrelog fenotipa, a naročito onih  $CD4-CD8+$  fenotipa (Ito i sar., 2002), povećanje procentualne zastupljenosti zrelih  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  timocita kod neonatalno androgenizovanih životinja, moglo bi biti posledica povećane ekspresije Thy-1 molekula i sledstveno smanjenog intenziteta signala koji se prenose posredstvom pre- $TCR\alpha\beta$  i  $TCR\alpha\beta$  kompleksa. Drugo, povećanje procentualne zastupljenosti zrelih ćelija  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  fenotipa kod neonatalno androgenizovanih životinja, moglo bi se povezati i sa povećanjem ukupnog broja i procentualne zastupljenosti ćelija koje ispoljavaju fenotip zrelih NKT ćelija ( $CD161+TCR\alpha\beta+$ ) u timusu ovih životinja. Ova pretpostavka proističe iz podataka koji pokazuju da: 1) NKT ćelije imaju sposobnost kontinuirane sekrecije  $IFN-\gamma$  (Berzins i sar., 2006) i 2) izlaganje nezrelih timocita delovanju  $IFN-\gamma$  u prisustvu IL-6 ili IL-2, *in vitro* dovodi do usmeravanja njihove diferencijacije/sazrevanja ka citotoksičnim T-limfocitima (Takai i sar., 1988). Nalazi koji ukazuju na efikasnije linijsko usmeravanje pozitivno selektovanih timocita ka ćelijama  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  fenotipa kod neonatalno androgenizovanih životinja, u skladu su sa nalazima koji ukazuju na smanjenu osetljivost timocita ovih životinja na delovanje estrogena. Naime, nađeno je da davanje estrogena *in vitro* i *in vivo* dovodi do favorizovanog linijskog usmeravanja timocita ka ćelijama  $CD4+CD8-$  fenotipa (Screpanti i sar., 1989; Brunelli i sar., 1992; Kovacs i Olsen, 1998). Konačno, kako je pokazano da zrele  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  i  $CD4+CD8-TCR\alpha\beta^{++}$  ćelije proliferišu neposredno pred izlazak iz timusa, što predstavlja završnu fazu njihove diferencijacije/sazrevanja (Penit i Vasseur, 1997; Le Campion i

sar., 2000; Le Campion i sar., 2002), povećana proliferacija zrelih CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> ćelija u odnosu na CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> mogla bi da doprinese povećanoj procentualnoj zastupljenosti CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocita u timusu neonatalno androgenizovanih životinja. Povećanje procentualne zastupljenosti BrdU+ ćelija (nezavisno od prisustva ConA) u okviru subpopulacije ćelija koje ispoljavaju visok nivo ekspresije CD3 molekula (CD3<sup>++</sup>) u kulturi timocita izolovanih iz neonatalno androgenizovanih životinja u odnosu na kontrolne životinje govori u prilog povećanoj pre-emigracionoj proliferaciji zrelih CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> i CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocita kod ovih životinja. Ovaj nalaz je u saglasnosti i sa povećanim brojem ćelija obe subpopulacije najzrelijih timocita kod neonatalno androgenizovanih životinja. Međutim, za sada nema podataka koji bi podržali selektivnu proliferaciju CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> u odnosu na CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> ćelije.

Generalno, na osnovu svih prethodno iznetih podataka može se zaključiti da neonatalna androgenizacija dovodi do promena u procesu diferencijacije/sazrevanja timocita koje, najverovatnije, obuhvataju: 1) povećan ulazak progenitorskih ćelija, njihovu povećanu proliferaciju i ubranu diferencijaciju/sazrevanje; 2) povećanu efikasnost  $\beta$ -selekcije timocita; 3) povećanu efikasnost pozitivne, a smanjenu efikasnost negativne selekcije timocita (što se može povezati sa povećanom gustinom Thy-1 molekula na timocitima koji ulaze u selekzione procese); 4) favorizovano linijsko usmeravanje timocita ka ćelijama CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> fenotipa (Šema 1).

Podaci dobijeni kod miša i kod pacova ukazuju da polni steroidi imaju odlučujuću ulogu u linijskom usmeravanju timocita (Ansar Ahmed i sar., 1985; Leposavić i sar., 1996; Kovacs i Olsen, 1998). Budući da je pokazano da je u timusu mužjaka miša favorizovano linijsko usmeravanje timocita ka ćelijama CD4-CD8+ fenotipa (Ansar Ahmed i sar., 1985), kao i da davanje testosterona orhidektomisanim miševima dovodi do favorizovane diferencijacije/sazrevanja timocita ka ćelijama CD4-CD8+ fenotipa (Kovacs i Olsen, 1998), nalaz povećane procentualne zastupljenosti timocita CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> fenotipa kod neonatalno androgenizovanih životinja, mogao bi da implicira da neonatalni tretman testosteronom, pored povećane efikasnosti stvaranja T-ćelija u ranom adultnom uzrastu, dovodi i do promene u obrascu linijskog usmeravanja timocita, odnosno do fenotipske defeminizacije/maskulinizacije ovog procesa.

### ***5.1.3. Uticaj neonatalne androgenizacije na fenotipske karakteristike T-limfocita u perifernoj krvi i slezini***

Prethodno navedeni nalazi ukazuju da je kod neonatalno androgenizovanih životinja povećana efikasnost timopoeze. Pokazano je da krajnji efekat promena u sazrevanju timocita na zastupljenost T-ćelijskih populacija na periferiji zavisi prevashodno od raspoloživosti faktora neophodnih za preživljavanje novoformiranih T-limfocita (Surh i Sprent, 2008; Houston i sar., 2011). Budući da je pokazano da estradiol i progesteron, delujući posredstvom specifičnih receptora, mogu uticati na funkciju akcesornih ćelija, pre svega DC u perifernim limfoidnim organima (Liu i sar., 2002; Khan i sar., 2005; Butts i sar., 2007), koje obezbeđuju signale neophodne za preživljavanje novoformiranih T-limfocita (Houston i sar., 2011), može se pretpostaviti da je neonatalna androgenizacija uticala i na raspoloživost faktora neophodnih za preživljavanje novoformiranih T-limfocita, pa posledično i na zastupljenost T-ćelijskih populacija na periferiji. Kako bi se sagledao krajnji efekat promena u procesu diferencijacije/sazrevanja T-ćelija indukovanih jednokratnim davanjem testosterona u kritičnom neonatalnom periodu na periferni T-ćelijski odeljak, analizirana je zastupljenosti svežih timusnih emigranata kao i zastupljenost glavnih populacija T-limfocita u perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja.

U perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih životinja nađen je povećan procenat svežih timusnih emigranata u populaciji i CD4+ i CD8+ limfocita, kao i povećanje njihovog ukupnog broja u odnosu na kontrolne životinje (Šema 1). Ovaj nalaz jasno podržava pretpostavku da neonatalni tretman testosteronom dovodi do povećanja efikasnosti diferencijacije/sazrevanja timocita i posledično, povećanja izlaska novoformiranih T-limfocita na periferiju. Budući da je najznačajnija posledica involucije timusa smanjenje zastupljenosti novoformiranih T-limfocita, tzv. svežih timusnih emigranata na periferiji usled smanjene timopoeze (Berzins i sar., 1998; Globerson i Efros, 2000; Romanyukha i Yarshin, 2003; Taub i Longo, 2005), prethodno pomenuti nalazi idu u prilog hipotezi da neonatalna androgenizacija dovodi do promena u sazrevanju/odlaže involuciju timusa obezbeđujući efikasniju timopoezu kod mladih adultnih životinja.

Uprkos povećanju broja CD4+ i CD8+ svežih timusnih emigranata u perifernoj

krvi i slezini, samo je broj CD8<sup>+</sup> T-limfocita bio povećan u ispitivanim odeljcima imunskog sistema neonatalno androgenizovanih životinja. Kako je kod neonatalno androgenizovanih životinja pokazano značajno povećanje ukupnog broja CD4-CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocita, kao i ukupnog broja CD8<sup>+</sup> svežih timusnih emigranata, može se zaključiti da povećanje procenta i ukupnog broja CD8<sup>+</sup> T-limfocita u perifernoj krvi i slezini odražava promene u procesu diferencijacije/sazrevanja timocita kod ovih životinja. Međutim, povećanje ukupnog broja CD4<sup>+</sup>CD8-TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocita, kao i CD4<sup>+</sup> svežih timusnih emigranata, nije rezultiralo proporcionalnim povećanjem broja CD4<sup>+</sup> T-limfocita. Ovi nalazi mogli bi da ukazuju da je, uprkos povećanom stvaranju ovih ćelija u timusu neonatalno androgenizovanih životinja raspoloživost signala koji su neophodni za preživljavanje novoformiranih CD4<sup>+</sup> T-limfocita na periferiji bila promenjena. Naime, novoformirane T-ćelije, nakon izlaska iz timusa u mikrosredinama sekundarnih limfoidnih organa dobijaju signale (kontakt sa kompleksom sopstveni p/MHC i IL-7) neophodne za preživljavanje (Houston i sar., 2008). Imajući u vidu da su različiti signali neophodni za preživljavanje CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T-limfocita (kontakt sa kompleksom sopstveni p/MHC I klase za CD8<sup>+</sup>, a kontakt sa kompleksom sopstveni p/MHC II klase za CD4<sup>+</sup> T-limfocite) (Takeda i sar., 1996; Nešić i Vukmanović, 1998; Surh i Sprent, 2008), može se pretpostaviti da je smanjena dostupnost signala neophodnih za preživljavanje svežih timusnih emigranata CD4<sup>+</sup> fenotipa, kod neonatalno androgenizovanih životinja, dovela do gubitka ovih ćelija na periferiji. Kod neonatalno androgenizovanih životinja detektovan je i visok nivo testosterona u serumu. Iako za sada nema podataka o ekspresiji AnR u akcesornim ćelijama imunskog sistema kod neonatalno androgenizovanih životinja, podaci da kod miša davanje testosterona dovodi do smanjenja ekspresije MHC molekula II klase na makrofagama (Mayr i sar., 2006), koje pored DC obezbeđuju signale neophodne za preživljavanje novoformiranih T-limfocita mogli bi da idu u prilog smanjenog preživljavanja CD4<sup>+</sup> T-limfocita kod ovih životinja. Sa druge strane, pokazano je da davanje estradiola povećava procentualnu zastupljenost CD4<sup>+</sup> limfocita kod miša (Grossman, 1985). U svetlu ovih podataka smanjenje procentualne zastupljenosti CD4<sup>+</sup> T-limfocita kod neonatalno androgenizovanih životinja išlo bi u prilog smanjene osetljivosti bilo samih limfocita, bilo ćelija strome perifernih limfoidnih organa na delovanje estrogena. Kao što je prethodno navedeno, smanjena osetljivost ćelija na delovanje estrogena bi se mogla

objasniti fenomenom „pogrešnog“ hormonskog programiranja ER u ovim ćelijama i/ili smanjenom koncentracijom slobodnog, biološki aktivnog oblika hormona u cirkulaciji (Mertens i Verhoeven, 1985).

Izraženije povećanje broja CD8<sup>+</sup> svežih timusnih emigranata u perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih životinja dovelo je do promene odnosa svežih timusnih emigranata CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> fenotipa u oba analizirana periferna odeljka imunskog sistema. Ove promene su dovele do disproporcionalnog povećanja broja CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita u korist CD8<sup>+</sup> T-limfocita (Šema 1). Podaci iz ranijih istraživanja pokazuju da je povećana zastupljenost CD8<sup>+</sup> limfocita karakteristika perifernih limfoidnih odeljaka mužjaka (Grossman, 1985; Shames, 2002). Shodno tome, porast procentualne zastupljenosti CD8<sup>+</sup> limfocita u perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih u odnosu na kontrolne životinje, bi mogao da se posmatra kao znak fenotipske defeminizacije/maskulinizacije ovih odeljaka imunskog sistema.

#### ***5.1.3.1. Uticaj neonatalne androgenizacije na ćelije sa regulatornim fenotipom***

Budući da je pokazano da mikrosredina timusa, obezbeđuje uslove za diferencijaciju/sazrevanje ne samo konvencionalnih T-ćelija, već i ćelija koje učestvuju u supresiji autoreaktivnih ćelija na periferiji, pre svega Treg i NKT (Shevach, 2002; Sakaguchi, 2004; La Cava i sar., 2006; Godfrey i sar., 2010), što predstavlja takozvanu treću funkciju timusa (Seddon i Mason, 2001), u timusu, perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja, ispitivana je i zastupljenost ovih subpopulacija T-limfocita.

##### ***5.1.3.1.1. CD161+TCRαβ+ ćelije***

U perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih životinja zabeleženo je izraženo povećanje procentualne zastupljenosti i ukupnog broja NKT ćelija zrelog, CD161+TCRαβ<sup>+</sup> fenotipa (Šema 1). Imajući u vidu da je kod ovih životinja zabeleženo i povećanje procentualne zastupljenosti i ukupnog broja ovih ćelija u timusu nameće se zaključak da je povećanje broja i procentualne zastupljenosti NKT ćelija u analiziranim odeljcima imunskog sistema posledica njihovog povećanog stvaranja i izlaska iz timusa (Šema 1). Budući da je pokazano da kod pacova 80% NKT ćelija ispoljava CD8

koreceptorski molekul (Matsuura i sar., 2000), povećanje procentualne zastupljenosti, kao i ukupnog broja svežih timusnih emigranata CD8<sup>+</sup> fenotipa u perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih životinja išlo bi u prilog ove pretpostavke. Drugo moguće objašnjenje za ovaj nalaz bi bila povećana proliferacija NKT ćelija u perifernim limfoidnim odeljcima kod neonatalno androgenizovanih životinja u poređenju sa kontrolnim životinjama. Kako je pokazano da *in vitro* estradiol ne utiče na proliferaciju NKT ćelija kod miša (Gourdy i sar., 2005), a nema podataka o uticaju drugih polnih steroida na proliferaciju ovih ćelija, ova pretpostavka je ipak, malo verovatna. Konačno, ako se ima u vidu da NKT ćelije mogu nastati i izvan timusa, u jetri i slezini (Sato i sar., 1995; Makino i sar., 1997), povećana ekstratimusna produkcija NKT ćelija mogla bi takođe da doprinese povećanju zastupljenosti NKT kod neonatalno androgenizovanih životinja. U prilog ove pretpostavke bi išlo povećanje ekstratimusne produkcija T-limfocita kod miša, nakon davanja estradiola (Okuyama i sar., 1992; Narita i sar., 1998). Međutim, ako se imaju u vidu prethodno navedeni nalazi da neonatalna androgenizacija dovodi do značajnog smanjenja osetljivost ER na delovanje estrogena i u ćelijama drugih tkiva (uterusa, pojedinih moždanih struktura, jetri i masnom tkivu) (Gerall i Kenney., 1970; Whalen i Luttge, 1971; Gerall i sar., 1972; Lobl, 1975; Mertens i Verhoeven, 1985; Watanobe i Habu, 2003), povećana ekstratimusna produkcija T-ćelija kao posledica pojačanog delovanja estrogena izgleda malo verovatno. Drugim rečima, izgleda sasvim verovatno da je povećanje procentualne zastupljenosti i ukupnog broja NKT ćelija u perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih životinja posledica njihovog povećanog stvaranja u timusu.

#### **5.1.3.1.2. CD4+CD25+FoxP3+ ćelije**

U perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih životinja uočeno je izraženo povećanje procenta i ukupnog broja CD4+CD25+FoxP3+ limfocita (Šema 1). Nalaz povećanog broja CD4+CD25+FoxP3+ ćelija u timusu, kao i povećan broj svežih timusnih emigranata CD4<sup>+</sup> fenotipa u perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih životinja, upućuje na zaključak da je povećana procentualna zastupljenost i ukupan broj CD4+CD25+FoxP3+ limfocita u analiziranim limfoidnim odeljcima posledica njihovog povećanog stvaranja u timusu. Iako se ovo čini potpuno logičnim, treba imati u na umu da ćelije CD4+CD25+FoxP3+ fenotipa mogu nastati i

na periferiji, aktivacijom zrelih konvencionalnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita pod specifičnim uslovima suboptimalnog izlaganja antigenima i/ili kostimulaciji (Curotto de Lafaille i Lafaille, 2009; Josefowicz i Rudensky, 2009). Podaci koji ukazuju da estradiol, delujući posredstvom ER, kod miša povećava ekspresiju gena za FoxP3 u CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> limfocitima i da davanje estradiola, kao i graviditet povećavaju procentualnu zastupljenost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> limfocita u slezini (Polanczyk i sar., 2004; Polanczyk i sar., 2005) išli bi u prilog povećanog stvaranja CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> limfocita na periferiji. Budući da za sada ne postoje pouzdani fenotipski markeri koji bi omogućili razdvajanje Treg timusnog porekla i Treg nastalih na periferiji, bez određivanja udela ćelija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> fenotipa u populaciji CD4<sup>+</sup> svežih timusnih emigranata, teško je opredeliti se za jedno ili drugo objašnjenje, odnosno nije moguće tvrditi da li je povećanje procentualne zastupljenosti i ukupnog broja Treg u perifernoj krvi i slezini neonatalno androgenizovanih životinja posledica njihovog povećanog stvaranja u timusu i/ili na periferiji. Međutim, kao što je prethodno navedeno, neonatalni tretman testosteronom dovodi do značajnog smanjenja osetljivost ćelija na delovanje estrogena usled „pogrešnog“ hormonskog programiranja ER u limfoidnim ćelijama i/ili usled smanjene koncentracije slobodnog, biološki aktivnog oblika ovog hormona u cirkulaciji (Mertens i Verhoeven, 1985). Prema tome, može se pretpostaviti da povećana procentualna zastupljenost i ukupan broj Treg u perifernoj krvi i u slezini neonatalno androgenizovanih životinja, najverovatnije nisu posledica njihovog povećanog stvaranja na periferiji.

Poseban značaj utvrđivanju da li kod neonatalno androgenizovanih životinja dolazi i do promena u stvaranju regulatornih ćelija daju prethodno navedeni nalazi da kod ovih životinja dolazi do smanjenja efikasnosti negativne selekcije i verovatno povećanog stvaranja potencijalno autoreaktivnih T-ćelija u timusu.

#### ***5.1.4. Uticaj neonatalne androgenizacije na zastupljenost timusnih epitelnih ćelija i ekspresiju gena za IL-6 i IL-7 u tkivu timusa***

TEC čine važnu komponentu timusne mikrosredine, koja se tokom ontogeneze, u značajnoj meri, remodeluje. Ove promene, s jedne strane, utiču na efikasnost timopoeze, a sa druge strane, makar delimično, nastaju kao rezultat promena u samom



---

procesu diferencijacije/sazrevanja timocita. Dinamička međuzavisnost između TEC i timocita opisuje se u anglosaksonskoj literaturi, terminom „thymic cross-talk“ (Kyewski, 1987; Anderson i sar., 1993; Boyd i sar., 1993; van Ewijk i sar., 1994; van Ewijk i sar., 2000; Hikosaka i sar., 2008). Imajući sve ovo u vidu, analizirana je relativna zastupljenost TEC na presecima timusa 3 meseca starih neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja istog uzrasta.

Određivanje udela pan-citokeratin+ ćelija u ukupnoj površini timusnog preseka je pokazalo da nije bilo značajnih razlika u relativnoj zastupljenosti TEC na presecima timusa neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja. S obzirom da kod glodara, za razliku od čoveka, involucija timusa počinje ili se, makar, drastično ubrzava u pubertetu (Utsuyama i sar., 1989; Bodey i sar., 1997), jasno je u da se timusu adultnih 3 meseca starih životinja mogu očekivati involutivne promene. Imajući u vidu da se incijalne promene u atrofiji i tokom involucije timusa uočavaju u timusnoj stromi (Fletcher i sar., 2009), moglo bi se pretpostaviti da kod neonatalno androgenizovanih životinja, s odlaganjem puberteta, timus dostiže maksimalnu masu i celularnost kasnije (najverovatnije u uzrastu između 60. i 90. dana) nego kod kontrolnih životinja (45. dana). Shodno tome, moglo bi se takođe spekulirati i da involutivne promene, koje uključuju propadanje timusne epitelne komponente (Gray i sar., 2006), počinju kasnije kod neonatalno androgenizovanih pacova, ali da 90. postnatalnog dana (uprkos značajno većoj masi timusa i ukupnom broju timocita) relativna zastupljenost TEC postiže vrednosti koje se bitno ne razlikuju od vrednosti ovog parametra kod kontrolnih životinja.

Ekspresija iRNK za IL-6, koji u fiziološkim uslovima u timusu adultnih životinja uglavnom sintetišu TEC (Mainiero i sar., 2003; Yarilin i Belyakov, 2004) nije se značajno razlikovala u uzorcima timusa neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja (Šema 1). IL-6 kod pacova najverovatnije sintetišu TEC lokalizovane subkapsularno i intramedularno (Čolić i sar., 1991; von Patay i sar., 1998; 1999). Ovakva lokalizacija u timusu u saglasnosti je sa ulogom koju ovaj citokin ima u procesu diferencijacije/sazrevanja timocita (Mainiero i sar., 2003; Yarilin i Belyakov, 2004). Naime, pokazano je da IL-6, stimulišući sekreciju drugih citokina (IL-1 i IL-8) posredno učestvuje u regulaciji proliferacije i preživljavanja najnezrelijih timocita

(Wolf i Cohen, 1992), dok direktnim delovanjem u timusnoj meduli, stimuliše preživljavanje i proliferaciju najzrelijih CD4+CD8- i CD4-CD8+ timocita (Mainiero i sar., 2003; Yarilin i Belyakov, 2004; Tan i sar., 2011). Pored toga, pokazano je da IL-6 autokrino deluje na preživljavanje/proliferaciju TEC koje ga sintetišu i da je ovim ćelijama imanentan regulatorni mehanizam negativne povratne sprege, koji obezbeđuje optimalno održavanje koncentracije IL-6 u timusu (Meilin i sar., 1995; 1997; Tseng i sar., 2010). Konkretnije, porast koncentracije IL-6 u timusu, ograničavanjem preživljavanja/proliferacije TEC koje ga sekretuju sprečava prekomerni porast koncentracije IL-6 u timusu i njegovo potencijalno štetno delovanje i *vice versa* (Semprowski i sar., 2000; Mainiero i sar., 2003; Colombara i sar., 2005; Huang i sar., 2005; Tseng i sar., 2010). Iako nema direktnih podataka o promeni zastupljenosti subpopulacija TEC koje sintetišu IL-6 u timusu neonatalno androgenizovanih životinja, na osnovu prethodno iznetih podataka može se pretpostaviti da u timusu ovih životinja nije došlo do promene u relativnoj zastupljenosti ovih ćelija. Imajući u vidu da IL-6 stimuliše preživljavanje/proliferaciju timocita na ranim i na kasnim stadijumima diferencijacije/sazrevanja, kao i podatke da je kod neonatalno androgenizovanih životinja pokazana povećana proliferacija/smanjena apoptoza timocita na ranim i kasnim razvojnim stadijumima, može se pretpostaviti da promene u timopoezi koje su detektovane kod 3 meseca starih neonatalno androgenizovanih životinja, najverovatnije nisu posledica izmenjenje koncentracije ovog citokina, već rezultat drugih promena u limfoidnoj, odnosno epitelnoj komponenti timus, u uslovima izmenjenog gonadnog hormonskog „miljea“ kod ovih životinja.

U poređenju sa uzorcima tkiva kontrolnih životinja, u uzorcima tkiva neonatalno androgenizovanih životinja izmereno je izraženo smanjenje nivoa iRNK za IL-7 (Šema 1). Ovaj citokin u timusu miša sintetišu TEC lokalizovane, pretežno, u dubokom korteksu i meduli timusa (Alves i sar., 2008; Mazzucchelli i sar., 2009). Pokazano je da ekspresija iRNK za IL-7 u timusu raste sa atrofijom organa dosežući maksimalan nivo onda kada je atrofija najjače izražena, kao i da se smanjuje sa regeneracijom organa (Zubkova i sar., 2005). Osim toga pokazano je da promena ekspresije iRNK za IL-7 u timusu ne zavisi od tretmana (uključujući i davanje estradiola) koji je doveo do atrofije (Zubkova i sar., 2005), već od broja timocita koji su „prošli“  $\beta$ -selekciju u timusu (svi CD4+CD8+, CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> i CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> timociti) (Zubkova i sar.,

2005; Zoller i Kersh, 2006; Alves i sar., 2010). Naime, pokazano je da postoji dvosmerna komunikacija između TEC koje sintetišu IL-7 i timocita koji su „prošli“  $\beta$ -selekciju, tako da se ekspresija gena za IL-7 povećava onda kad se smanji broj ovih ćelija u timusu, a smanjuje onda kada on poraste (Alves i sar., 2010). U svetlu ovih saznanja smanjenje ekspresije gena za IL-7 u timusu neonatalno androgenizovanih životinja moglo bi se pripisati značajnom povećanju broja timocita koji su „prošli“  $\beta$ -selekciju kod neonatalno androgenizovanih životinja ( $60.47 \times 10^7 \pm 0.18 \times 10^7/\text{timus}$ ) u odnosu na kontrolne životinje ( $39.01 \times 10^7 \pm 0.19 \times 10^7/\text{timus}$ ).

Na osnovu svih prethodno navedenih podataka, moglo bi se zaključiti da je u timusu neonatalno androgenizovanih životinja povećanje efikasnosti timopoeze u uzrastu od 3 meseca bilo praćeno aktivacijom intratimusnih regulatornih mehanizama, koji ograničavaju povećanje broja TEC, broja timocita kao i efikasnosti timopoeze (autokrina regulacija sekrecije IL-6 mehanizmom negativne povratne sprege i regulacija ekspresije gena za IL-7 mehanizmom negativne povratne sprege od strane timocita koji su „prošli“  $\beta$ -selekciju). Drugim rečima, moglo bi se pretpostaviti je kod 3 meseca starih neonatalno androgenizovanih životinja, uprkos povećanoj efikasnosti timopoeze u odnosu na kontrolne životinje istog uzrasta, došlo do aktivacije mehanizama koji ograničavaju preživljavanje/proliferaciju, makar subpopulacije TEC koje sintetišu IL-6, kao i mehanizama koji limitiraju efikasnost timopoeze. Potvrda ove pretpostavke, nameće potrebu ispitivanja prethodno pomenutih parametara kod neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja u nešto ranijem uzrastu (između 60. i 90. postnatalnog dana).

#### ***5.1.5. Uticaj neonatalne androgenizacije na koncentraciju noradrenalina u timusu i zastupljenost adrenergičkih receptora na timocitima***

Imajući u vidu podatke koji ukazuju da hormoni jajnika utiču na koncentraciju kateholamina u timusu (Clarke i Kendall, 1994; Kendall i sar., 1994; Pilipović i sar., 2008) i da kateholamini posredstvom AR mogu uticati na proces diferencijacije/sazrevanja timocita (Rauški i sar., 2003; Leposavić i sar., 2006; 2007, 2010; Pešić i sar., 2007; 2009), jasno je da bi prethodno opisane promene u diferencijaciji/sazrevanju timocita mogle biti posledica, ne samo direktnog delovanja

---

polnih steroida na timocite i ćelije timusne strome, već i njihovog indirektnog delovanja posredstvom kateholamina. U skladu sa tim, da bi se utvrdio značaj mogućih promena u delovanju kateholamina na timopoezu, u timusu neonatalno androgenizovanih životinja određivana je koncentracija noradrenalina, kao najzastupljenijeg kateholamina u timusu pacova (Pilipović i sar., 2008) i ekspresija AR na timocitima.

U timusu neonatalno androgenizovanih životinja nađeno je značajno povećanje koncentracije noradrenalina (Šema 1). Pokazano je da u timusu pored simpatičkih nervnih završetaka, koji predstavljaju glavni izvor noradrenalina (Felten i sar., 1985; Bellinger i sar., 1992; Cavallotti i sar., 1999), limfoidne i nelimfoidne ćelije takođe sintetišu kateholamine (Screpanti i sar., 1995; Kranz i sar., 1997; Pilipović i sar., 2008). Da bi se procenio doprinos različitih izvora noradrenalina u nastanku promene u koncentraciji ovog neurotransmitera/hormona u timusu neonatalno androgenizovanih životinja određivana je zastupljenost noradrenergičkih nervnih vlakana i gustina timocita i drugih ćelija timusne strome, koje sintetišu kateholamine i procenjivan je, indirektno, na osnovu intenziteta fluorescence, sadržaj noradrenalina u njima.

Nije bilo značajnih razlika u topografiji i procentualnoj zastupljenosti noradrenergičkih nervnih vlakana na presecima timusa neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja, ali je intenzitet fluorescence, koju su emitovala ova vlakna nakon tretmana SPG rastvorom, bio značajno veći kod neonatalno androgenizovanih životinja u odnosu na kontrolne životinje. Povećan intenzitet fluorescentnog signala koji je poticao iz noradrenergičkih nervnih vlakana, ukazivao je na povećan sadržaj kateholamina u njima. Objašnjenje za ovaj nalaz možda bi moglo da leži u podacima koji pokazuju da: 1) postoji seksualni dimorfizam u organizaciji i aktivnosti noradrenergičkih neurona u hipotalamusu pacova, tako da je u hipotalamusu mužjaka znatno veća ekspresija TH nego kod životinja ženskog pola, što se dovodi u vezu sa pojačanom aktivnošću ovih neurona (Simerly, 1989; Plut i sar., 2002) i 2) da su u hipotalamusu idenifikovane grupe neurona koje kontrolišu aktivnost simpatičkih vlakana koja inervišu timus (Trotter i sar., 2007). Konkretnije, veći sadržaj noradrenalina u noradrenergičkim nervnim vlaknima kod neonatalno androgenizovanih životinja mogao bi se objasniti većom aktivnošću noradrenergičkih neurona u hipotalamusu ovih životinja. Veća ekspresija TH u neuronima hipotalamusa kod neonatalno androgenizovanih ženki bi se mogla objasniti trajnim efektima perinatalnog

gonadnog hormonskog „miljea“ na funkcijski razvoj mozga glodara, posebno u smislu njegove seksualne diferencijacije (Hutchison, 1997; Segovia i sar., 1999; McCarthy i sar., 2002). Naime, pokazano je da je mozak glodara seksualno bipotentan i da njegova dalja seksualna diferencijacija zavisi od koncentracije polnih steroida u kritičnom perinatalnom periodu. Kod mužjaka, do defeminizacije/maskulinizacije mozga ne dolazi zahvaljujući direktnom delovanju testosterona, već kao posledica njegove lokalne konverzije u estradiol, delovanjem citohrom P-450 enzima prisutnih u određenim moždanim regionima (George i Ojeda, 1982). Tako nastali estradiol, vezujući se za ER, kontroliše različite aspekte diferencijacije moždanih struktura (Wilson i Davies, 2007). Estradiol je takođe neophodan za potpunu feminizaciju mozga ženki, ali u znatno nižim koncentracijama (Wilson i Davies, 2007). Na osnovu ovih podataka može se pretpostaviti da je neonatalni tretman testosteronom doveo do defeminizacije/maskulinizacije hipotalamusnih neurona koji kontrolišu inervaciju timusa, i posledično do defeminizacije/maskulinizacije timusnih simpatičkih nervnih vlakana, što se ogleda u povećanom sadržaju noradrenalina njima.

Imunocitohemijskim bojenjem i kvantifikacijom ćelija koje sadrže TH na presecima timusa, pokazano je da bi povećanje koncentracije noradrenalina u timusu neonatalno androgenizovanih životinja moglo, makar delimično, da odražava i povećanje zastupljenosti limfoidnih i nelimfoidnih ćelija koje sintetišu kateholamine u timusu ovih životinja. Ovaj nalaz bi se mogao objasniti promenama u postnatalnoj seksualnoj diferencijaciji timusa, koja se odvijala nezavisno od promena u hipotalamusu, kao što je to pokazano za druga periferna tkiva (Ohta, 1995). U prilog ove pretpostavke idu nalazi: 1) da ćelije timusa sadrže citohrom P-450 enzime koji učestvuju u aromatizaciji testosterona i njegovoj konverziji u estradiol (Martin, 2000; Thangavel i sar., 2007); 2) da ćelije timusa ispoljavaju ER u kritičnom neonatalnom periodu (de Fougères Nunn i sar., 1999); 3) da je timus seksualno dimorfan organ (Leposavić i sar., 1996; de Fougères Nunn i sar., 1999; Pilipović i sar., 2008) i 4) da se u timusu, seksualni dimorfizam uspostavlja u istom kritičnom neonatalnom periodu kada i u hipotalamusu, i istim testosteron-zavisnim mehanizmima (de Fougères Nunn i sar., 1999). Dakle, povećanje gustine TH<sup>+</sup> ćelija u timusu kod neonatalno androgenizovanih ženki moglo bi da se pripíše defeminizaciji/maskulinizaciji timusa, usled visoke koncentracije testosterona u kritičnom neonatalnom periodu. U prilog

prethodne pretpostavke može se navesti veća gustina TH+ ćelija u timusu odraslih mužjaka pacova AO soja u odnosu na ženke istog uzrasta i soja (Pilipović i sar., 2008).

Povećanoj koncentraciji noradrenalina u timusu neonatalno androgenizovanih životinja bi mogla da doprinese i povećana sinteza noradrenalina u timocitima. Budući da je pokazano da estrogen stimulatorno deluje na transkripciju gena za TH u ćelijama pojedinih moždanih struktura (Herbison i sar., 2000), kao i na aktivnosti samog enzima u ćelijama tkiva nadbubrega i pojedinim nervnim ćelijama (Kohler i sar., 1975; Serova i sar., 2002; Anglin i Brooks, 2003), ovaj nalaz bi se mogao povezati sa povećanim nivom estrogena u serumu neonatalno androgenizovanih životinja. Međutim, ako se uzme u obzir da je kod neonatalno androgenizovanih životinja nađena smanjena gustina ER $\alpha$  u timocitima, malo je verovatno da se povećanje sadržaja TH u timocitima ovih životinja može pripisati delovanju estrogena. Drugo moguće objašnjenje za ovaj nalaz bi bila povećana osetljivost timocita kod neonatalno androgenizovanih životinja na delovanje testosterona. U prilog ove pretpostavke govori : 1) povećanje koncentracije testosterona u serumu neonatalno androgenizovanih životinja; 2) povećanje gustine AnR u timocitima neonatalno androgenizovanih životinja kao i 3) nalazi koji ukazuju na direktno stimulatorno delovanje androgena na ekspresiju gena za TH (Jeong i sar., 2006; Kvetnansky i sar., 2009).

Konačno, treba istaći da je na presecima timusa neonatalno androgenizovanih životinja nađeno povećanje intenziteta fluorescentnog signala koji potiče iz ćelija koje sintetišu katecholamine. Imajući u vidu da, pored timocita, i ćelije strome timusa ispoljavaju AnR (Raveche i sar., 1980; McCrudden i sar., 1981), može se pretpostaviti da je do povećanja sadržaja noradrenalina i u ovim ćelijama, došlo usled njegove povećane sinteze.

Da bi se sagledao mogući fiziološki značaj porasta koncentracije noradrenalina u timusu neonatalno androgenizovanih životinja, analizirana je ekspresija  $\beta_2$ -AR na timocitima. Pokazano je da je u timusu neonatalno androgenizovanih životinja došlo do smanjenja prosečne površinske gustine  $\beta_2$ -AR na timocitima (Šema 1). Imajući u vidu ovaj nalaz, iako trenutno nema podataka o eventualnim promenama u efikasnosti prenosa signala posredovanog  $\beta_2$ -AR na timocitima, može se pretpostaviti da kod neonatalno androgenizovanih životinja dolazi do smanjenja osetljivosti ćelija na

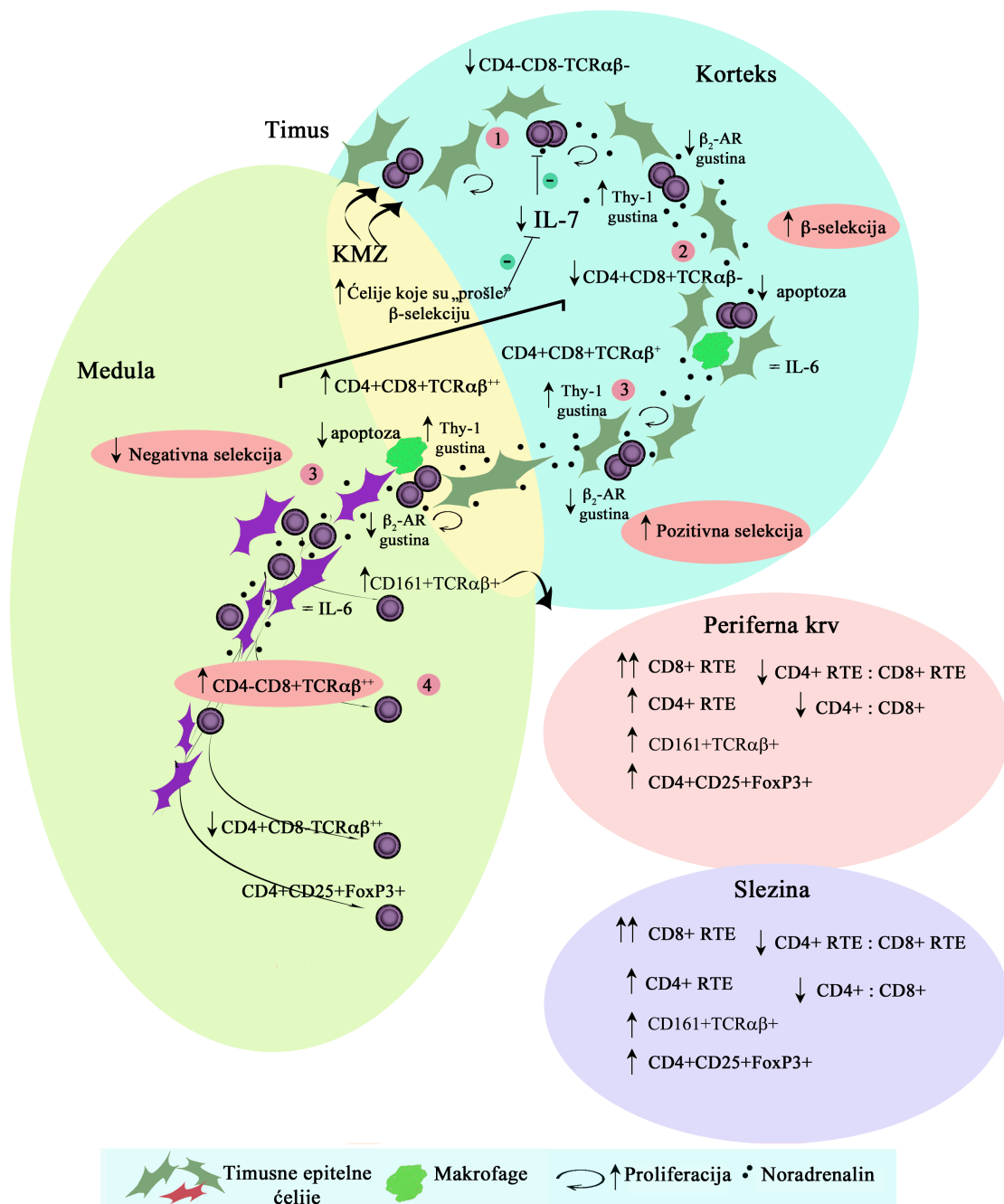
delovanje kateholamina posredstvom ovog tipa adrenergičkih receptora. Budući da postoje podaci da dugotrajno izlaganje noradrenalinu dovodi do smanjenja ekspresije  $\beta$ -AR na ćelijama jajnika pacova i smanjene osetljivosti ovih ćelija na delovanje kateholamina (Barria i sar., 1993), moglo bi se pretpostaviti da je povećana koncentracija noradrenalina u timusu ovih životinja dovela do smanjenja površinske gustine  $\beta_2$ -AR na timocitima. Pored toga, podaci koji govore da je kod žena sa sindromom policističnih jajnika (kod kojih je zabeležen visok nivo androgena u serumu) smanjena ekspresija  $\beta$ -AR na ćelijama masnog tkiva (Arner, 2005), ukazuju da bi se promena u ispoljavanju  $\beta_2$ -AR kod neonatalno androgenizovanih životinja mogla pripisati i povećanoj koncentraciji testosterona u serumu ovih životinja (De Pergola i sar., 1991). U prilog ove pretpostavke ide i povećanje gustine ekspresije AnR u timocitima neonatalno androgenizovanih životinja. Konačno, imajući u vidu da je kod neonatalno androgenizovanih životinja gustina ekspresije ER $\alpha$  u timocitima takođe bila smanjena, kao i podatke koji ukazuju da nivo ekspresije  $\beta_2$ -AR korelira sa nivoom estradiola u serumu (Marchetti i sar., 1994), smanjena ekspresija  $\beta_2$ -AR na timocitima neonatalno androgenizovanih životinja mogla bi se pripisati smanjenoj osetljivosti timocita ovih životinja na delovanje estrogena. U prilog pretpostavke da je u timusu neonatalno androgenizovanih životinja, uprkos povećanoj koncentraciji noradrenalina, delovanje kateholamina na proces diferencijacije/sazrevanja timocita bilo smanjeno usled smanjene efikasnosti  $\beta_2$ -AR posredovane signalizacije, ide nalaz povećane površinske gustine Thy-1 molekula na timocitima (Šema 1). Naime, s obzirom da: 1) egzogeni cAMP i noradrenalin, putem post-transkripcione destabilizacije, smanjuju nivo iRNK za Thy-1 molekul u ćelijama mišije ćelijske linije S49 (Wajeman-Chao i sar., 1998); 2) propranolol u potpunosti inhibira razgradnju iRNK za Thy-1 indukovanu noradrenalinom i dovodi do povećanja ekspresije Thy-1 na ovim ćelijama (Wajeman-Chao i sar., 1998), nalaz povećane gustine ekspresije Thy-1 molekula na timocitima neonatalno androgenizovanih životinja mogao bi se pripisati smanjenoj efikasnosti prenosa signala posredstvom  $\beta$ -AR kod ovih životinja.

Imajući u vidu podatke da kateholamini svoj uticaj na timopoezu ostvaruju delovanjem ne samo posredstvom  $\beta$ -AR, već i posredstvom  $\alpha_1$ -AR (Pešić i sar., 2009; Leposavić i sar., 2010), analizirana je ekspresija  $\alpha_1$ -AR na timocitima neonatalno androgenizovanih i kontrolnih životinja. Jednokratno davanje testosterona u kritičnom

neonatalnom periodu dovelo je do smanjenje procentualne zastupljenosti  $\alpha_1$ -AR+ timocita, a nije uticalo na prosečnu površinsku gustinu ovog receptora na timocitima odraslih životinja. Ako se imaju u vidu podaci da kod pacova većinu  $\alpha_1$ -AR+ timocita čine ćelije najnezrelijeg CD3- fenotipa i da timociti, u procesu sazrevanja, nishodno regulišu ekspresiju  $\alpha_1$ -AR (Pešić i sar., 2009), nalaz smanjene procentualne zastupljenosti  $\alpha_1$ -AR+ timocita u timusu neonatalno androgenizovanih pacova u skladu je sa smanjenim procentom nejnezrelijih CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - ćelija kod ovih životinja. Imajući u vidu da je homogenatu timusnog tkiva neonatalno androgenizovanih životinja nađeno povećanje koncentracije noradrenalina, uprkos nepromenjenoj gustini  $\alpha_1$ -AR na timocitima, mogla bi se očekivati povećana efikasnost  $\alpha_1$ -AR-posredovane modulacije diferencijacije/sazrevanja timocita. Međutim, kako je kod neonatalno androgenizovanih životinja pokazana povećana proliferacija najnezrelijih CD3- timocita kao i favorizovano linijsko usmeravanje timocita ka ćelijama CD4-CD8+TCR $\alpha\beta^{++}$  fenotipa, podaci koji pokazuju da 14-dnevni tretman antagonistom  $\alpha_1$ -AR, kod pacova, dovodi do povećanja ukupnog broja timocita usled povećane proliferacije CD3- timocita i favorizovanog linijskog usmeravanja timocita ka ćelijama CD4+CD8-TCR $\alpha\beta^{++}$  fenotipa (Pešić i sar., 2009; Leposavić i sar., 2010), ne idu u prilog povećane efikasnosti delovanja noradrenalina posredstvom  $\alpha_1$ -AR na timocite.

Svi prethodno navedeni rezultati iz prve grupe eksperimenata jasno ukazuju da je promenama u razvoju H-H-G osovine i odlaganjem puberteta moguće dovesti do promena u razvoju/involuciji timusa i sledstveno do promena u efikasnosti timopoeze kod mladih adultnih životinja. Tretman testosteronom u kritičnom neonatalnom periodu, je pored povećanja efikasnosti timopoeze, doveo i do promene obrasca odvijanja ovog procesa u smislu efikasnijeg stvaranja CD8+ T-limfocita, što je odlika procesa timopoeze kod mužjaka (Ansar Ahmed i sar., 1985). U nastanku ovih promena, važnu ulogu imalo smanjenje efikasnosti delovanja kateholamina (noradrenalina) posredstvom  $\beta_2$ -AR.





Šema 1. Šematski prikaz efekata jednokratnog davanja testosterona u neonatalnom uzrastu na diferencijaciju/sazrevanje timocita i fenotipske karakteristike T-limfocita periferne krvi i slezine mladih adultnih ženki pacova.

Neonatalna androgenizacija dovodi do promena u kinetici razvoja/involuciji timusa što se kod mladih adultnih pacova manifestuje kao povećanje efikasnosti timopoeze (uključujući, najverovatnije, i povećano stvaranje ćelija CD4+CD25+FoxP3+ i CD161+TCRαβ+ fenotipa), na šta ukazuje povećan broj svežih timusnih emigranata (engl. recent thymic emigrants, RTE) CD4+ i, posebno, CD8+ fenotipa u perifernoj krvi i slezini ovih životinja. Povećanje efikasnosti timopoeze najverovatnije odražava: 1) povećan ulazak, proliferaciju i ubranu diferencijaciju progenitorskih ćelija (ćelije CD4-CD8-TCRαβ-

---

fenotipa); 2) povećanu efikasnost  $\beta$ -selekcije, koja, mehanizmom negativne povratne sprege, smanjuje ekspresiju iRNK za IL-7 u timusu, što, moguće, ograničava diferencijaciju najnezrelijih timocita CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - fenotipa i efikasnost timopoeze; 3) povećanu efikasnosti pozitivne selekcije/smanjenu efikasnost negativne selekcije, makar delimično, usled, povećane ekspresije Thy-1 molekula (kao regulatora visine selekcionog „praga“ timocita), što se može povezati sa smanjenom gustinom ekspresije  $\beta_2$ -adrenergičkih receptora ( $\beta_2$ -AR) na timocitima i posledično smanjenjem negativnog regulatornog uticaja kateholamina na ekspresiju iRNK za Thy-1 u timocitima. Favorizovano usmeravanje diferencijacije/sazrevanja CD4+CD8+TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita ka ćelijama CD4-CD8+TCR $\alpha\beta^{++}$  fenotipa, najverovatnije, dovodi do pomeranja odnosa zastupljenosti CD4+ i CD8+ RTE i T-limfocita u perifernoj krvi i slezini ka ćelijama CD8+ fenotipa kod neonatalno androgenizovanih životinja. Uprkos većoj efikasnosti timopoeze kod neonatalno androgenizovanih životinja, nepromenjena zastupljenost timusnih epitelnih ćelija uz nepromenjenu ekspresiju iRNK za IL-6 u tkivu timusa ukazuje da je kod ovih životinja, najverovatnije, došlo do pokretanja mehanizama negativne povratne sprege koji ograničavaju ekspanziju timusnih epitelnih ćelija koje sekretuju IL-6. KMZ, kortiko-medularna zona;

## 5.2. Uticaj ovarijektomije na timus odraslih životinja

Naredni deo ovog istraživanja usmeren je na traženje odgovora na pitanje da li su hormoni jajnika neophodni za održavanje i/ili napredovanje involucije timusa.

### 5.2.1. Uticaj ovarijektomije na masu i celularnost timusa

Hirurško uklanjanje jajnika ženkama pacova u uzrastu od 10 meseci, kada su prisutni jasni znaci uznapredovale involucije timusa (Perišić i sar., 2010), imalo je za posledicu povećanje mase timusa i ukupnog broja timocita kod 11 meseci starih ženki pacova, ne samo u odnosu na kontrolne životinje istog uzrasta, nego i u odnosu na kontrolne životinje starosti 10 meseci. Ovi podaci ukazuju da uklanjanje hormona jajnika ne dovodi samo do zaustavljanja dalje progresije involucije timusa, već i da se njihovim uklanjanjem može postići delimična reverzija involutivnih promena.

Povećanje ukupnog broja timocita kod ovarijektomisanih životinja može se, makar delimično, objasniti promenama u apoptozi i proliferaciji timocita. Naime, na presecima timusa ovarijektomisanih životinja nađeno je značajno smanjenje broja apoptotičnih timocita koji su pokazivali membransko bojenje aneksinom V u poređenju sa kontrolnim životinjama istog uzrasta. Ovi nalazi su u saglasnosti sa brojnim podacima iz *in vivo* i *in vitro* studija u kojima je pokazano da davanje estradiola smanjuje preživljavanje timocita (Mor i sar., 2001; Hoffman-Goetz i sar., 2001; Okasha i sar., 2001; Yao i Hou, 2004). Značajno smanjenje broja apoptotičnih timocita u korteksu timusa ovarijektomisanih životinja, gde su uglavnom locirani CD4+CD8+ timociti, koji podležu procesima selekcije (Takahama, 2006), u saglasnosti je sa podacima koji ukazuju da, kod adultnih miševa, davanje estradiola dovodi do povećanja apoptoze CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ - timocita (ćelije koje su „prošle“  $\beta$ -selekciju i započinju rearanžman TCR $\alpha$  genskog lokusa), kao i CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> timocita (Wang i sar., 2008), koji predstavljaju ćelije koje ulaze u selekzione procese (Zamoyska i Lovatt, 2004). Smanjenu osetljivost timocita ovarijektomisanih životinja na apoptozu podržavaju i rezultati dobijeni u 18-časovnoj kulturi timocita. Naime, procentualna zastupljenost apoptotičnih ćelija u kulturi timocita 11 meseci starih ovarijektomisanih životinja, bila je značajno niža nego u kulturi timocita izolovanih iz kontrolnih životinja istog uzrasta.

Pored podataka koji ukazuju na smanjenu apoptozu timocita, kod ovarijektomisanih životinja pokazano je i značajno povećanje zastupljenosti proliferišućih ćelija u sveže izolovanim suspenzijama timocita. Ovaj nalaz upućuje na povećanu proliferaciju timocita u timusu ovarijektomisanih životinja. U skladu sa ovom pretpostavkom je i nalaz povećane proliferacije u kulturi timocita u odsustvu ConA, izolovanih iz ovarijektomisanih životinja u poređenju sa timocitima izolovanim iz kontrolnih životinja. Prethodno navedeni podaci koreliraju sa nalazima drugih autora koji ukazuju da tretman estradiolom smanjuje spontanu proliferaciju timocita adultnih miševa, kao i da ova promena prethodi smanjenju celularnosti čitavog organa (Gulino i sar., 1985; Okuyama i sar., 1992; Zoller i Kersh, 2006).

Pored smanjene apoptoze i povećane proliferacije timocita, povećanje ukupnog broja timocita kod 11 meseci starih ovarijektomisanih životinja moglo bi se povezati i sa promenama u zastupljenosti najnezrelijih, progenitorskih ćelija koje su detektovane u timusu ovih životinja. Naime, kod miša je pokazano da male promene u broju i procentualnoj zastupljenosti najnezrelijih progenitorskih ćelija u timusu mogu značajno doprineti povećanju broja timocita (Schnell i sar., 2006). Shodno tome, povećanje procentualne zastupljenosti i ukupnog broja ćelija najnezrelije frakcije CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - timocita, CD45RC+CD2- ćelija, moglo bi, barem delimično, da doprinese povećanju ukupnog broja timocita kod ovarijektomisanih životinja. U prilog ove pretpostavke mogli bi se navesti podaci koji pokazuju da izlaganje visokim dozama estradiola, dovodi do smanjenja broja prekursora T-ćelija u timusu miša (Zoller i Kersh, 2006).

Treba napomenuti da uklanjanje ovarijuma dovodi do nedostatka ne samo steroidnih, već i nesteroidnih hormona jajnika (inhibina i aktivina) koji takođe utiču na proliferaciju i diferencijaciju/sazrevanje timocita, pre svega onih koji se nalaze na najranijim razvojnim stadijumima i posledično utiču na celularnost čitavog organa (Hedger i sar., 1989, 2000; Licon-Limón i sar., 2009). Međutim, budući da je da kod inhibin  $\alpha^{-/-}$  miševa, pokazan zastoj u diferencijaciji/sazrevanju timocita na najranijim stadijumima ovog procesa i posledično smanjenje ukupnog broja timocita (Licon-Limón i sar., 2009), povećanje ukupnog broja timocita nakon uklanjanja hormona jajnika najverovatnije nije bilo posledica deficita ovog hormona. Sa druge strane, podaci

dobijeni u *in vitro* ispitivanjima koji pokazuju da aktivin deluje supresivno na proliferaciju najnezrelijih timocita (Hedger i sar., 1989, 2000), sugerišu da bi povećanje proliferacije najnezrelijih timocita i efikasnosti njihove diferencijacije/sazrevanja kod ovarijektomisanih životinja moglo, barem delimično, da odražava nedostatak ovog hormona.

### 5.2.2. Uticaj ovarijektomije na sazrevanje T-ćelija

Prethodno navedeni rezultati ukazuju da je uklanjanje jajnika životinjama sa uznapredovalim involutivnim promenama timusa dovelo do povećanja ukupnog broja timocita menjajući procese apoptoze i proliferacije, kao i zastupljenosti najnezrelijih progenitorskih ćelija u timusu. S obzirom da se tokom involucije timusa smanjuje ne samo ukupan broj timocita, već dolazi i do promena u procesu diferencijacije/sazrevanja ovih ćelija (Thoman, 1995; Aspinall, 1997; Capri i sar., 2000), fenotipskom analizom timocitinih subpopulacija kod 11 meseci starih ovarijektomisanih i kontrolnih životinja pokušali smo da utvrdimo da li je nedostatak hormona jajnika u uzrastu kada su involutivne promene timusa uznapredovale zaista doveo i do promena u procesu timopoeze.

Kao što je prethodno navedeno, u timusu 11 meseci starih ovarijektomisanih životinja detektovano je povećanje procentualne zastupljenosti i ukupnog broja ćelija progenitorske frakcije CD45RC+CD2- fenotipa u okviru najnezrelijih CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - timocita. Izraženo povećanje kako procentualne zastupljenosti, tako i ukupnog broja ovih ćelija, uz nepromenjen procenat i povećan broj ćelija koje nastaju njihovom diferencijacijom (CD45RC+CD2+ i CD45RC-CD2+ timocita), ukazuje da u odsustvu hormona jajnika dolazi do povećanog ulaska progenitorskih ćelija u timus, njihove povećane proliferacije, i ubrzane diferencijacije/sazrevanja. U prilog povećane proliferacije najnezrelijih timocita ide nalaz povećane proliferacije ćelija CD3- fenotipa, u kulturi timocita izolovanih iz ovarijektomisanih životinja u odnosu na kulturu timocita izolovanih iz kontrolnih životinja (Šema 2). Podaci koji pokazuju da kod miša, estradiol, delujući posredstvom ER $\alpha$ , dovodi do zastoja na najranijem stadijumu diferencijacije/sazrevanja timocita (Wang i sar., 2008) takođe podržavaju ovu pretpostavku. S druge strane, treba istaći da je na membrani prekursora B-ćelija nađena teška izoforma CD45R antigena (Woollett i sar., 1985), pa se može pretpostaviti

da je povećanje procentualne zastupljenosti prekursornih B-ćelija i sledstveno njihov povećan ulazak u timus, takođe doprineo povećanju zastupljenosti CD45RC+CD2-timocita. U prilog ove pretpostavke govore podaci da davanje estradiola, pored poremećaja u diferencijaciji/sazrevanju timocita, dovodi i do zastoja u diferencijaciji/sazrevanju B-ćelija (Kincade i sar., 2000; Medina i sar., 2001).

Analiza fenotipskog profila timocita, pokazala je da je ovarijektomija, kod životinja sa uznapredovalim involutivnim promenama timusa dovela do povećanja procentualne zastupljenosti CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> i CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocita, a smanjila procentualnu zastupljenost njihovih prethodnika CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ - timocita. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa nalazima drugih autora koji pokazuju da davanje estradiola dovodi do selektivnog gubitka CD4+CD8+ ćelija u timusu (Screpanti i sar. 1989; Brunelli i sar., 1992; Rijhsinghani i sar., 1996; Laposavić i sar., 2001; Zoller i Kersh, 2006). Povećana procentualna zastupljenosti CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> timocita, koji predstavljaju ćelije koje ulaze u pozitivnu selekciju (Zamoyska i Lovatt, 2004), uz povećanu procentualnu zastupljenost CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> ćelija koje su „prošle“ ovaj proces (Shortman i sar., 1991) i smanjenu procentualnu zastupljenost njihovih prethodnika, CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ - ćelija, u suspenzijama timocita ovarijektomisanih životinja, sugerise efikasniju pozitivnu selekciju u odsustvu hormona jajnika (Šema 2). Nalaz smanjene zastupljenost apoptotičnih timocita, na presecima timusa ovarijektomisanih životinja, u dubokom korteksu, gde su uglavnom lokalizovane ćelije koje podležu procesu pozitivne selekcije (Takahama, 2006), podržava prethodnu pretpostavku. Osim toga, u prilog povećane efikasnosti pozitivne selekcije kod ovarijektomisanih životinja govore i podaci iz studije na transgenim (engl. transgenic, Tg) HY-TCR miševima, koji pokazuju da davanje sintetskog estradiola, dietilsilbestrola (DES) utiče na efikasnost pozitivne selekcije kod ženki ovih miševa (Brown i sar., 2006). Naime, kod Tg HY-TCR miševa, većina T-ćelija ispoljava TCR specifičan za H-Y antigen (engl. the minor histocompatibility (H) male-specific (Y) antigen, HY), koji je kodiran genom lociranim na Y hromozomu (Smcy gen), tako da se ispoljava samo u tkivu mužjaka. Zahvaljujući tome, većina timocita kod ženki ovih miševa, „prolazi“ pozitivnu selekciju u timusu, dok većina timocita kod mužjaka biva eliminisana kroz proces negativne selekcije (Kisielow i sar., 1988; Teh i sar., 1988). Davanje DES imalo je različite efekte na selekzione procese kod mužjaka i ženki HY-TCR-Tg miševa

(Brown i sar., 2006). Pokazano je da davanje DES smanjuje pozitivnu selekciju timocita, procentualnu zastupljenost i broj CD4+CD8+ timocita, što ima za posledicu izrazito smanjenje celularnosti timusa kod ženki HY-TCR-Tg miševa (Brown i sar., 2006). Takođe, budući da je pokazano da je smanjenje pozitivne selekcije nakon tretmana DES-om kod HY-TCR-Tg ženki miševa praćeno povećanom gustinom ekspresije TCR $\alpha\beta$  na timocitima i posledično promenom aviditeta interakcije TCR $\alpha\beta$  i kompleksa sopstveni p/MHC molekul na ćelijama timusne strome (Dave i sar., 1999; Brown i sar., 2006), smanjena površinska gustina TCR $\alpha\beta$  na timocitima ovarijektomisanih životinja, merena prosečnim intenzitetom fluorescence ( $38.65 \pm 0.97$ ) u poređenju sa kontrolnim životinjama ( $42.95 \pm 0.58$ ), takođe je u saglasnosti sa većom efikasnošću pozitivne selekcije. Osim toga, imajući u vidu činjenicu da estrogeni stimulišu prezentaciju antigena od strane različitih tipova ćelija u timusu (DC, B-ćelije, ćelije mijeloidne loze), tako što modulišu nivo ekspresije B7.1 i B7.2 kostimulatornih molekula (Wira i sar., 2003), logično je u odsustvu ovih hormona očekivati manje efikasnu prezentaciju antigena, promenu afiniteta/aviditeta interakcije TCR $\alpha\beta$ -sopstveni p/MHC i sledstveno povećanu efikasnost pozitivne selekcije.

Konačno, iako je uklanjanje hormona jajnika dovelo do povećanja brojnosti najzrelijih CD4+CD8-TCR $\alpha\beta^{++}$  i CD4-CD8+TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita, procentualna zastupljenost ovih ćelija ostala je nepromenjena. Ovaj nalaz sugerise da efikasnija pozitivna selekcija, koja je dovela do povećanja zastupljenosti CD4+CD8+TCR $\alpha\beta^{++}$  timocita kod ovarijektomisanih životinja, nije dovela do proporcionalnog povećanja procentualne zastupljenosti ćelija najzrelijeg fenotipa. U skladu sa tim, može se pretpostaviti da je kod ovarijektomisanih životinja došlo do povećanja efikasnosti negativne selekcije i sledstveno, eliminacije timocita i/ili usporene diferencijacije/sazrevanja ćelija koje su „prošle“ pozitivnu selekciju. A osim toga može se pretpostaviti da je kod ovih životinja smanjena pre-emigratorna proliferacija i/ili povećan izlazak novoformiranih T-ćelija. Ako se imaju u vidu podaci da kod mužjaka HY-TCR-Tg miševa davanje DES dovodi do povećanja negativne selekcije timocita (Brown i sar., 2006), kao i da tretman estradiolom kod životinja kojima su uklonjeni jajnici povećava efikasnost prezentacije antigena od strane antigen prezentujućih ćelija (Wira i sar., 2003), povećanje negativne selekcije kod ovarijektomisanih životinja izgleda malo verovatno. Osim toga, imajući u vidu da od gustine ekspresije Thy-1

zavisi intenzitet signala koji timocit prima posredstvom  $TCR\alpha\beta$  i, shodno tome, ishod selekcionog procesa koji ovaj signal pokreće u timocitima koji „prolaze“ selekzione procese ( $TCR\alpha\beta^+$  i  $TCR\alpha\beta^{++}$ ) (Killeen, 1997; Hueber i sar., 1997), nalaz povećane površinske gustine Thy-1 kod ovarijektomisanih životinja u suprotnosti je sa pretpostavkom da je kod ovih životinja povećana efikasnost negativne selekcije. Konačno, budući da se u KMZ i u meduli uglavnom nalaze ćelije koje podležu procesu negativne selekcije (Takahama, 2006), smanjena gustina apoptotičnih ćelija u KMZ i meduli timusa ovarijektomisanih životinja u poređenju sa kontrolnim životinjama, takođe je u suprotnosti sa pretpostavkom da je kod ovarijektomisanih životinja povećana negativna selekcija. Zapravo, svi prethodno navedeni nalazi ukazuju na to da je kod ovarijektomisanih životinja smanjena negativna selekcija timocita (Šema 2).

U prilog pretpostavke da je kod ovarijektomisanih životinja usporena diferencijacija/sazrevanje  $CD4+CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  timocita mogli bi se navesti nalazi do kojih je došla Isabela Screpanti sa saradnicima (1989). Ova grupa istraživača je pokazala je da davanje estradiola ubrzava sazrevanje ćelija koje su dobile signal za preživljavanje, odnosno prelazak  $CD4+CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  ćelija na naredni stadijum ( $CD4+CD8-TCR\alpha\beta^{++}$  i  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$ ) diferencijacije/sazrevanja u timusu miša.

Nepromenjen procenat najzrelijih  $CD4+CD8-TCR\alpha\beta^{++}$  i  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  timocita uprkos povećanom procentu njihovih prethodnika,  $CD4+CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  timocita, mogao bi da se objasni manjom pre-emigratornom proliferacijom najzrelijih timocita kod ovarijektomisanih životinja. Imajući u vidu da IL-6, direktnim delovanjem u timusnoj meduli, stimuliše preživljavanje i proliferaciju najzrelijih  $CD4+CD8-$  i  $CD4-CD8+$  timocita (Mainiero i sar., 2003; Yarilin i Belyakov, 2004; Tan i sar., 2011), smanjena ekspresija gena za IL-6 koja je detektovana u tkivu timusa ovarijektomisanih životinja, mogla bi biti odgovorna za manju pre-emigratornu proliferaciju najzrelijih  $CD4+CD8-TCR\alpha\beta^{++}$  i  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  timocita.

Konačno, neslaganje u procentualnoj zastupljenosti  $CD4+CD8-TCR\alpha\beta^{++}$  i  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  timocita i njihovih prethodnika moglo bi da se objasni povećanim izlaskom zrelih ćelija na periferiju kod ovarijektomisanih životinja (Šema 2). Nalaz povećanog broja i procentualne zastupljenosti svežih timusnih emigranata u populaciji  $CD4+$  i  $CD8+$  limfocita u perifernoj krvi i slezini ovarijektomisanih životinja snažno



podržava ubrzano sazrevanje i izlazak novoformiranih T-limfocita iz timusa ovarijektomisanih životinja.

Na osnovu svih prethodno iznetih podataka može se zaključiti da uklanjanje jajnika u uzrastu kada su involutivne promene timusa znatno uznapredovale, dovodi ne samo do povećanja ukupnog broja timocita, već i do promena u procesu njihove diferencijacije/sazrevanja koji se ogledaju u: 1) povećanom ulasku, proliferaciji progenitorskih ćelija i njihovoj ubrzanom diferencijaciji/sazrevanju; 2) većoj efikasnosti pozitivne selekcije, a smanjenoj efikasnosti negativne selekcije timocita, što se može povezati sa povećanom gustinom ekspresije Thy-1 na timocitima, smanjenom gustinom ekspresije TCR $\alpha\beta$  a moguće i smanjenom efikasnošću prezentovanja antigena od strane antigen prezentujućih ćelija i 3) efikasnijem sazrevanju i izlasku novoformiranih T-ćelija na periferiju (Šema 2).

### ***5.2.3. Uticaj ovarijektomije na fenotipske karakteristike T-limfocita u perifernoj krvi i slezini***

U perifernoj krvi i slezini ovarijektomisanih životinja, pokazan je porast procentualne zastupljenosti i ukupnog broja svežih timusnih emigranata u populacijama CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita (Šema 2). Prethodni nalazi, u kontekstu neizmenjenog procenta, ali povećanog broja najzrelijih (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> i CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup>) timocita, potvrđuje pretpostavku da je ovarijektomija u uzrastu od 10 meseci dovela do povećane efikasnosti timopoeze i povećanog izlaska T-ćelija na periferiju kod 11 meseci starih životinja. Osim toga, ovaj nalaz ukazuje na povećanje raznovrsnosti antigenoskog repertoara periferne T-ćelijske populacije kod ovarijektomisanih životinja, što je od naročitog značaja u svetlu podataka da se sa involucijom timusa, izlazak novoformiranih T-ćelija, pa time i raznovrsnost antigenoskog repertoara periferne T-ćelijske populacije značajno smanjuju (Douek i sar., 1998; Berzins i sar., 1998; Globerson i Efros, 2000; Romanyukha i Yarshin, 2003). Budući da je pokazano da se odnos broja svežih timusnih emigranata u perifernoj krvi i ukupnog broja timocita u timusu ne menja tokom procesa involucije timusa, može se pretpostaviti da je broj svežih timusnih emigranata kod 11 meseci starih ovarijektomisanih životinja značajno

veći i u odnosu na 10 meseci stare kontrolne životinje. Ovo ukazuje da je kod životinja sa uznapredovalim involutivnim promenama timusa uklanjanje hormona jajnika dovelo do delimične reverzije involutivnih promena ne samo u timusu, već i do povećanog izlaska novoformiranih T-ćelija na periferiju. Nalaz povećane zastupljenosti svežih timusnih emigranata kod ovarijektomisanih životinja je u saglasnosti sa podacima da u slezini gravidnih miševa, kao i miševa tretiranih estradiolom dolazi do dramatičnog smanjenja zastupljenosti svežih timusnih emigranata (Zoller i sar., 2007).

Uklanjanje jajnika dovelo je i do povećanja ukupnog broja T-limfocita u slezini, što je u saglasnosti sa nalazima koji ukazuju da davanje estradiola redukuje ukupan broj splenocita, smanjujući ukupan broj T-ćelija u slezini (Biegel i sar., 1998). Međutim, uprkos povećanoj brojnosti T-ćelija, njihova procentualna zastupljenosti u suspenziji splenocita bila je smanjena. Ovaj nalaz čini osnovanom pretpostavku da uklanjanje hormona jajnika stimuliše stvaranje B-limfocita i da je ovaj efekat jače izražen nego efekat na T-limfocite. U prilog ove pretpostavke mogu se navesti podaci da tretman estradiolom, kao i graviditet, deluju supresivno na stvaranje B-ćelija u kostnoj srži (Medina i sar., 2001). Objašnjenje za ovaj nalaz možda bi moglo da leži u podacima koji ukazuju da je: 1) kod miša 30. dana nakon ovarijektomije u adultnom uzrastu (Ryan i sar., 2005) i 30. dana nakon ovarijektomije u uzrastu od 30. dana kod pacova (Perišić i sar., 2012) detektovano povećanje nivoa iRNK za IL-7 u homogenatu tkiva slezine, i 2) da je IL-7 neophodan ne samo za diferencijaciju/sazrevanje B- i T-limfocita (Kikuchi i sar., 2008; Willems i sar., 2011), već i za preživljavanje T-limfocita u perifernim limfoidnim odeljcima (Fry i Mackall, 2002).

Ovarijektomija nije uticala na procentualnu zastupljenost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita u perifernoj krvi i slezini. Međutim, iako promene u procentualnoj zastupljenosti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita nisu dosegle statističku značajnost, odnos CD4<sup>+</sup> : CD8<sup>+</sup> T-limfocita, tzv. imunoregulatorni indeks, bio je povećan u slezini ovarijektomisanih životinja. Ovaj nalaz mogao bi da ukazuje na smanjeno preživljavanje CD8<sup>+</sup>, a povećano preživljavanje CD4<sup>+</sup> T-limfocita i/ili povećano zadržavanje CD4<sup>+</sup> T-limfocita u slezinu. Imajući u vidu različitu prirodu signala neophodnih za preživljavanje CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita (Takeda i sar., 1996; Nešić i Vukmanović, 1998; Surh i Sprent, 2008) u prilog pretpostavke da je kod

ovarijektomisanih životinja povećano preživljavanje ovih ćelija u slezini idu nalazi da ovarijektomija, kod adultnih miševa dovodi do povećanja ekspresije MHC molekula II klase na akcesornim ćelijama u perifernim limfoidnim organima (Cenci i sar., 2003; Ryan i sar., 2005). Sa druge strane, budući da ovarijektomija kod adultnih miševa dovodi do smanjenja ekspresije hemokina neophodnih za migraciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita u slezinu, i posledično smanjenog ulaska CD4<sup>+</sup> limfocita u slezinu (Mo i sar., 2005), malo je verovatno da je povećanje odnosa CD4<sup>+</sup> : CD8<sup>+</sup> T-limfocita u slezini posledica povećanog ulaska ovih ćelija. Direktnije, povećanje zastupljenosti CD4<sup>+</sup> limfocita u slezini ovarijektomisanih životinja, najverovatnije je posledica njihovog boljeg preživljanja u slezini u odsustvu hormona jajnika. Ovaj nalaz naročito je značajan u svetlu podataka da sa involucijom timusa odnos procentualne zastupljenosti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita u perifernim limfoidnim odeljcima pomera u korist CD8<sup>+</sup> T-limfocita. (Sutherland i sar., 2005). Prema tome, može se pretpostaviti da hormoni jajnika, kod ženki pacova sa uznapredovalim znacima involucije timusa, učestvuju ne samo u regulaciji efikasnosti timopoeze, nego i da, delujući na periferiji, utiču na zastupljenost glavnih populacija T-limfocita.

### **5.2.3.1. Uticaj ovarijektomije na ćelije sa regulatornim fenotipom**

#### **5.2.3.1.1. CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelije**

Uklanjanje hormona jajnika dovelo je do povećanja ukupnog broja ćelija CD161+TCR $\alpha\beta$ + fenotipa u timusu, ali ne i do povećanja njihovog broja u perifernoj krvi i slezini (Šema 2). Ako se ima u vidu da, kod miša većinu novoformiranih NKT ćelija koje napuštaju timus odlikuje, uz ekspresiju TCR $\alpha\beta$  nizak nivo ekspresije CD161 molekula (Berzins i sar., 2006), moglo bi se spekulirati da je u uslovima nedostatka hormona jajnika smanjeno preživljavanje i/ili smanjena proliferacija ovih ćelija na periferiji. Međutim, pokazano je da estradiol ne utiče na proliferaciju NKT ćelija kod miša (Gourdy i sar., 2005), a nema podataka o uticaju hormona jajnika na faktore (pre svega IL-15) neophodne za preživljavanje ovih ćelija na periferiji (Godfrey i sar., 2010). Prema tome, prethodna pretpostavka čini se malo verovatnom. Sa druge strane, pokazano je da : 1) NKT ćelije mogu nastati i izvan timusa, u jetri i slezini (Sato i sar., 1995; Makino i sar., 1997) i 2) davanja estradiola povećava ekstratimusnu produkciju T-limfocita (Okuyama i sar., 1992; Narita i sar., 1998). Shodno tome, smanjenje

ekstratimusunog stvaranja NKT ćelija nakon uklanjanja hormona jajnika čini se verovatnijim objašnjenjem za prethodni nalaz. Ovo bi, u svetlu podataka da se ekstratimusno stvaranje T-limfocita povećava sa involucijom timusa i smanjenjem izlaska novoformiranih T-ćelija (Abo, 2001), moglo da ide u prilog reverzije involutivnih promena timusa nakon uklanjanja hormona jajnika.

#### **5.2.3.1.2. CD4+CD25+FoxP3+ ćelije**

Ovarijektomija je dovela do povećanja broja CD4+CD25+FoxP3+ ćelija u timusu. Ovaj nalaz saglasan je sa nalazom smanjenog broja CD4+CD25+ ćelija u timusu gravidnih ženki miševa (Zoller i sar., 2007). Pored toga, u perifernoj krvi i slezini ovarijektomisanih životinja povećan je procenat i ukupan broj ćelija CD4+CD25+FoxP3+fenotipa. Međutim, imajući u vidu činjenicu da ćelije istog fenotipa i mehanizma delovanja nastaju kako u timusu, tako i na periferiji (Curotto de Lafaille i Lafaille, 2009; Josefowicz i Rudensky, 2009), teško je sa sigurnošću tvrditi da je povećanje zastupljenosti ćelija regulatornog fenotipa u perifernoj krvi i slezini ovarijektomisanih životinja, posledica povećanog stvaranja i izlaska ovih ćelija iz timusa. Imajući u vidu da: 1) u uslovima visoke koncentracije estrogena u serumu dolazi do povećanog stvaranja CD4+CD25+FoxP3+ limfocita na periferiji, putem „konverzije“ naivnih CD4+ T-limfocita (Polanczyk i sar., 2004; 2005), i 2) je u timusu ovarijektomisanih životinja nađen povećan broj CD4+CD25+FoxP3+ ćelija, čini se mogućim da je povećanje zastupljenosti CD4+CD25+FoxP3+ limfocita u perifernoj krvi i slezini posledica njihove *de novo* sinteze u timusu (Šema 2). Ovo je naročito značajno u svetlu nalaza koji ukazuju da postoji pozitivna korelacija između supresivnog kapaciteta celokupne populacije perifernih Treg i zastupljenosti novoformiranih nTreg (Haas i sar., 2007). Budući da je sa involucijom timusa smanjuje stvaranje Treg ćelija u timusu (Leposavić i sar., 2006), povećano stvaranje ovih ćelija u timusu, kao i njihov povećan broj u perifernoj krvi i slezini 11 meseci starih ovarijektomisanih životinja, dalje podržava pretpostavku da uklanjanje hormona jajnika kod pacova sa uznapredovalim znacima involucije timusa, dovodi do ublažavanja timusnih promena i do, makar delimične, reverzije uzrasno-zavisnih promena u T-ćelijskom odeljku.

#### **5.2.4. Uticaj ovarijektomije na zastupljenost timusnih epitelnih ćelija i ekspresiju gena za IL-6 i IL-7 u tkivu timusa**

Analizom zastupljenosti TEC na presecima timusa pokazano je da je ovarijektomija dovela do povećanja njihove relativne zastupljenosti kod 11 meseci starih ovarijektomisanih životinja. Ovaj nalaz je saglasan sa podacima dobijenim u *in vitro* eksperimentima koji ukazuju na inhibitorno delovanje estradiola i progesterona na proliferaciju ćelija IT-45R1 pacovske epitelne timusne linije (Sakabe i sar., 1994). U istom smislu mogu se navesti i podaci koji pokazuju da kod miša, tokom graviditeta, dolazi do proporcionalnog gubitka kortikalnih i medularnih TEC (Zoller i sar., 2007). Imajući u vidu značaj TEC za diferencijaciju/sazrevanje timocita (Boyd i sar., 1993), kao i međusobnu zavisnost limfoidne i epitelne komponente timusa (Anderson i sar., 1993; van Ewijk i sar., 1994; van Ewijk i sar., 2000; Hikosaka i sar., 2008), ovaj nalaz je u saglasnosti sa povećanjem efikasnosti timopoeze kod ovarijektomisanih životinja. Pored toga, s obzirom da se inicijalne promene tokom involucije (gubitak TEC), ali i regeneracije u timusu uočavaju na nivou timusne epitelne komponente (Bertho i sar., 1997; Ortman i sar., 2002; Pearse, 2006; Gray i sar., 2006; Fletcher i sar., 2009), ekspanzija TEC bi, generalno, ukazivala na regenerativno delovanje nedostatka hormona jajnika na epitelnu komponentu timusa (Šema 2).

U odnosu na uzorke timusa 11 meseci starih kontrolnih životinja, u uzorcima timusnog tkiva 11 meseci starih ovarijektomisanih životinja, uprkos povećanoj zastupljenosti TEC, izmereno je smanjenje nivoa iRNK za IL-6 (Šema 2). Iako nema konkretnih podataka o relativnoj zastupljenosti subpopulacija TEC koje sintetišu IL-6, imajući u vidu postojanje autokrinog regulatornog mehanizma negativne povratne sprege u timusu koji reguliše sintezu IL-6 i biorasploživost ovog citokina (Meilin i sar., 1995; 1997; Tseng i sar., 2010), može se pretpostaviti da je inicijalna, nedostatkom hormona jajnika uslovljena ekspanzija TEC, uključujući i one koje sintetišu IL-6, dovela (povećanjem produkcije IL-6) do smanjenog preživljavanja/proliferacije ovih ćelija i sledstvenog smanjenja ekspresije iRNK za IL-6. S obzirom da se estradiol, u kompleksu sa ER, direktno vezuje za promoterski region gena za IL-6 i inhibira njegovu ekspresiju (Galien i Garcia, 1997) i da davanje estradiola kod miša dovodi do smanjenja ekspresije gena za IL-6 u timusu (Selvaraj i sar., 2005), može se pretpostaviti da je

zmanjenje zastupljenosti ćelija koje sintetišu IL-6, a ne ekspresije gena za IL-6 u ovim ćelijama dovelo do smanjenja nivoa iRNK za IL-6 u timusima ovarijektomisanih životinja. Ova pretpostavka se čini još verovatnijom kada se uzmu u obzir nalazi koji pokazuju da je do promene u ekspresiji IL-6, pored odsustva hormona jajnika, moglo da dovede i smanjenje koncentracije noradrenalina u tkivu timusa ovarijektomisanih životinja. Naime, pokazano je da: 1) kateholamini, delujući posredstvom  $\beta$ -AR, stimulišu sintezu IL-6 u kulturi TEC pacova (von Patay i sar., 1998) i 2) u uslovima nedostatka hormona jajnika dolazi do smanjenja koncentracije noradrenalina u timusu.

Pored smanjenja nivoa iRNK za IL-6, u uzorcima timusa ovarijektomisanih ženki pacova, nađeno je i smanjenje nivoa iRNK za IL-7 (Šema 2). Imajući u vidu prethodno navedene podatke koji ukazuju da ekspresija gena za IL-7 u timusu ne zavisi od estrogena (Zubkova i sar., 2005; Zoller i Kersh, 2006), već od broja timocita koji su „prošli“  $\beta$ -selekciju u timusu (svi  $CD4+CD8+$ ,  $CD4+CD8-TCR\alpha\beta^{++}$  i  $CD4-CD8+TCR\alpha\beta^{++}$  timociti) (Zubkova i sar., 2005; Zoller i Kersh, 2006; Alves i sar., 2010), može se pretpostaviti da je promena u ekspresiji gena za IL-7 posledica promena u timopoezi. Naime, u timusu ovarijektomisanih životinja nađeno je značajno povećanje ( $58.33 \times 10^7 \pm 2.27 \times 10^7$ /timus) broja timocita koji su „prošli“ kontrolnu tačku koja se označava kao  $\beta$ -selekcija u odnosu na kontrolne životinje ( $18.37 \times 10^7 \pm 1.25 \times 10^7$ /timus) (Šema 2).

U celini, prethodno diskutovani nalazi pokazuju da je uklanjanje hormona jajnika, u uzrastu kada su involutivne promene timusa uznapredovale, dovelo do ekspanzije timusnog epitela i povećanja efikasnosti timopoeze, ali i da je jedan mesec nakon ovarijektomije došlo do aktivacije regulatornih mehanizama koji ograničavaju preživljavanje/proliferaciju TEC koje sekretuju IL-6 i, sledstveno, smanjenja sadržaja iRNK za ovaj citokin, kao i do smanjenja ekspresije timostimulatornog citokina IL-7, što bi, zajedno, moglo da bude indikator smanjenja regenerativnih efekata ovarijektomije.

### **5.2.5. Uticaj ovarijektomije na koncentraciju noradrenalina u timusu i zastupljenost adrenergičkih receptora na timocitima**

Kako bi se upotpunila slika kompleksne uloge hormona jajnika u involuciji timusa, u timusima 11 meseci starih ovarijektomisanih i kontrolnih životinja analizirane su komponente intratimusnog regulatornog sistema koji čine kateholamini i AR.

Analizom sadržaja noradrenalina u timusu, pokazano je da uklanjanje hormona jajnika dovodi do značajnog smanjenja koncentracije noradrenalina u timusu 11 meseci starih životinja. Ovo se može povezati sa smanjenjem zastupljenosti noradrenergičkih nervnih vlakna i intenziteta fluorescence koju emituju ova vlakna nakon tretmana SPG rastvorom kod ovarijektomisanih životinja. U prilog ovom nalazu govore podaci da uklanjanje jajnika u peripubertetnom uzrastu kod pacova AO soja dovodi do smanjenja koncentracije noradrenalina u tkivu timusa, kao i smanjenja gustine noradrenergičkih nervnih vlakana (Pilipović i sar., 2008). Imajući u vidu da ženke pacova, u odnosu na mužjake, imaju znatno veći broj noradrenergičkih neurona u *locus-u coeruleus-u*, strukturi koja kontroliše aktivnost noradrenergičkih nervnih vlakana timusa (Guillamon i sar., 1988; Luque i sar., 1992), kao i da se ova razlika pripisuje stalnom aktivacionom delovanju estrogena (Pinos i sar., 2001), prethodno opisane promene u gustini noradrenergičke inervacije timusa mogu se povezati sa nedostatkom ovog hormona. Osim toga, smanjenje sadržaja kateholamina u noradrenergičkim nervnim vlaknima kod ovarijektomisanih životinja, može se takođe pripisati nedostatku estrogena, budući da je pokazano da estrogen stimuliše ekspresiju TH u nervnim ćelijama (Herbison i sar., 2000), njegovu aktivnost, pa posledično i sintezu kateholamina u ćelijama tkiva nadbubrega i pojedinim nervnim ćelijama (Kohler i sar., 1975; Serova i sar., 2002; Anglin i Brooks, 2003). S obzirom da je pokazano da tokom involucije timusa dolazi do povećanja gustine noradrenergičkih nervnih vlakana (Madden i sar., 1997, Cavallotti i sar., 1999, Leposavić i sar., 2010) i koncentracije noradrenalina ovom organu (Bellinger i sar., 1988, Madden i sar., 1997, Cavallotti i sar., 1999, Leposavić i sar., 2010), prethodno navedeni nalazi takođe ukazuju da uklanjanje jajnika ublažava involutivne promene u timusu.

Pored toga, analizom zastupljenosti TH+ ćelija na presecima timusa, pokazano je da je smanjenje koncentracije noradrenalina u timusu ovarijektomisanih životinja odražavalo, makar delimično, i smanjenje gustine limfoidnih i nelimfoidnih ćelija koje sintetisu kateholamine. Ovaj nalaz je u saglasnosti i sa smanjenim brojem ćelija koje emituju fluorescentni signal na presecima timusa ovarijektomisanih životinja nakon SPG tretmana. Prethodna ispitivanja kod pacova istog soja (Pilipović i sar., 2008) su pokazala da TH u timusu eksprimiraju TNC, makrofage i subpopulacije TEC lokalizovane, uglavnom u KMZ (Leposavić i sar., 2008; Pilipović i sar., 2008). Imajući u vidu da sa involucijom timusa raste gustina nelimfoidnih ćelija koje sadrže TH na presecima timusa (Leposavić i sar., 2010), može se zaključiti da uklanjanje jajnika u uzrastu kada su involutivne promene timusa uznapredovale dovodi, barem do delimične reverzije promena karakterističnih za involuciju timusa.

Pored promene u zastupljenosti TH+ nelimfoidnih ćelija na presecima timusa, u suspenzijama timocita 11 meseci starih ovarijektomisanih ženki pacova uočeno je i smanjenje zastupljenosti TH+ timocita. Budući da, kod miša, kateholamini inhibiraju proliferaciju limfocita koji ih sintetisu (Josefsson i sar., 1996), smanjena zastupljenost TH+ timocita kod ovarijektomisanih životinja, mogla bi se objasniti povećanjem sinteze noradrenalina u ovim ćelijama. U prilog ove pretpostavke ide i nalaz povećane gustine ekspresije TH u timocitima ovih životinja. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodno dobijenim podacima koji pokazuju da je koncentracija noradrenalina bila povećana u timocitima ženki pacova, istog soja, mesec dana nakon ovarijektomije u uzrastu od 30. dana (Pilipović i sar., 2008). Objašnjenje za ovaj nalaz možda bi moglo da leži u podacima koji ukazuju da estrogen, delujući posredstvom različitih subtipova klasičnih intracelularnih receptora ( $ER\alpha$  ili  $ER\beta$ ) može da poveća i da smanji sintezu TH (Maharjan i sar., 2005) i da su oba subtipa receptora prisutna su u ćelijama timusa pacova (Kuiper i sar., 1997). Konkretnije, povećanje gustine ekspresije TH moglo bi se pripisati povećanoj sintezi TH usled različitog uticaja nedostatka hormona jajnika na ekspresiju različitih tipova ER. U prilog ove pretpostavke mogli bi se navesti podaci da ovarijektomija kod adultnih miševa dovodi do promene u zastupljenosti  $ER\alpha$  i  $ER\beta$ , u ćelijama urogenitalnog trakta i u mišićnim ćelijama (Carley i sar., 2003; Baltgalvis i sar., 2010).



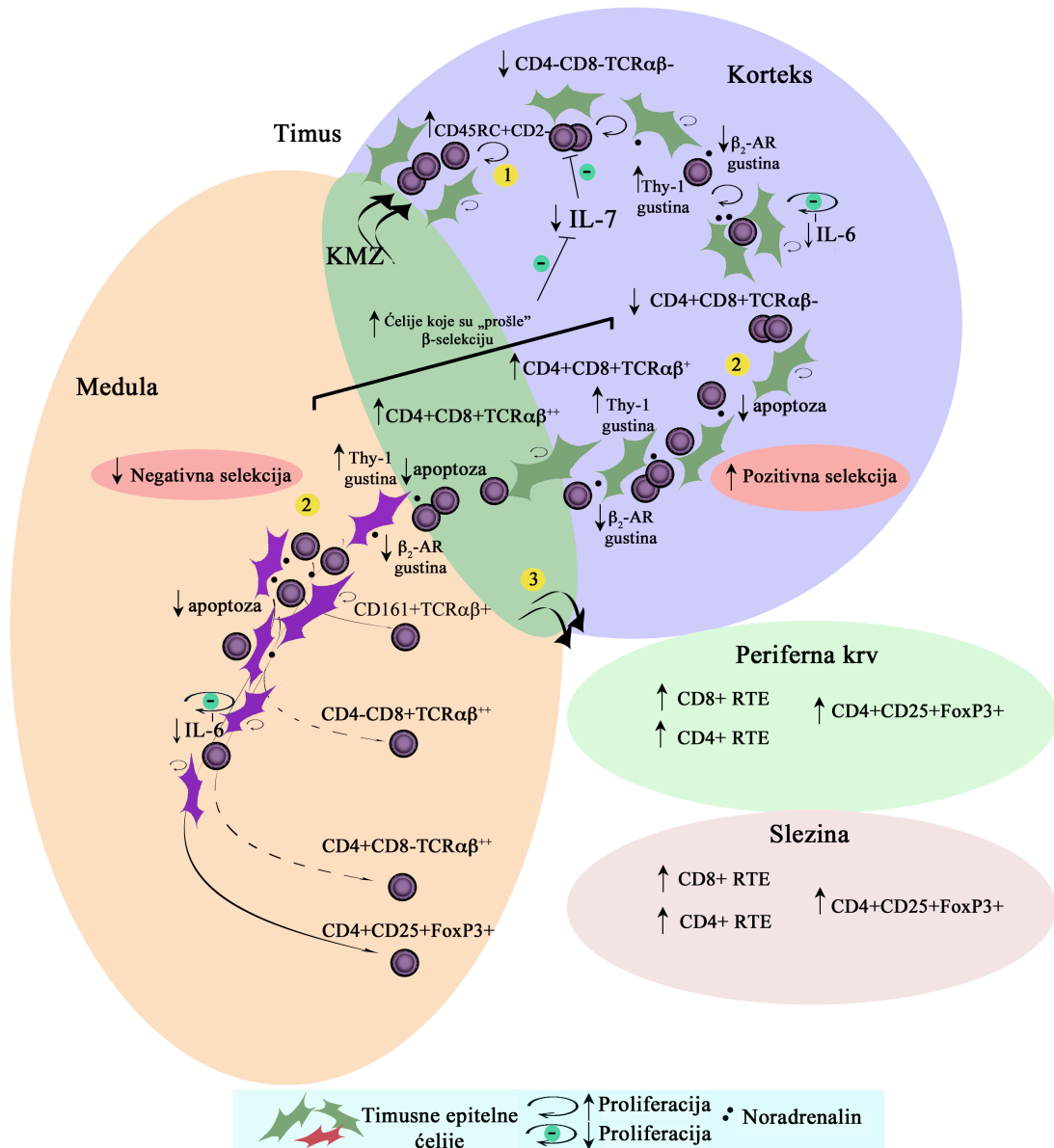
Pored promene u koncentraciji noradrenalina, u timusima ovarijektomisanih životinja nađeno je i smanjenje prosečne površinske gustine ekspresije  $\beta_2$ -AR na timocitima (Šema 2). S obzirom da je pokazano da u timusu adultnih ženki pacova tokom proestrusne i diestrusne faze estrusnog ciklusa i tokom graviditeta, kada je koncentracija estrogena u cirkulaciji visoka, dolazi do povećanja ekspresije gena za  $\beta_2$ -AR (Marchetti i sar., 1990; 1994), dobijeni nalaz može se povezati sa nedostatkom hormona jajnika. U prilog smanjene površinske gustine  $\beta_2$ -AR i moguće smanjene efikasnosti noradrenalin/ $\beta_2$ -AR signalnog kompleksa može se navesti nalaz smanjene površinske gustine ekspresije Thy-1 molekula na timocitima ovarijektomisanih životinja (Šema 2). Naime, kao što je već istaknuto u prethodnom poglavlju, noradrenalin (delujući posredstvom  $\beta$ -AR), smanjuje nivo iRNK za Thy-1 u T-ćelijama (Wajeman-Chao i sar.1998; LaJevic i sar., 2010 ), i sledstveno smanjuje efikasnost prenosa signala posredstvom TCR $\alpha\beta$  kompleksa (Hueber i sar., 1997; Killeen, 1997).

Konačno, imajući u vidu da davanje estrogena povećava ekspresiju  $\alpha_1$ -AR u nervnom i mišićnom tkivu (Roberts i sar., 1981;Wilkinson i Herdon, 1982; Shackelford i sar., 1987; Roberts i sar., 1989), analizirali smo njihovu ekspresiju na timocitima ovarijektomisanih i kontrolnih životinja. Analizom ekspresije  $\alpha_{1B}$ -AR na timocitima pokazano je da je nedostatak hormona jajnika nije uticao na prosečnu površinsku gustinu ovih receptora na  $\alpha_{1B}$ -AR+ timocitima. Ovaj nalaz bi se mogao pripisati suprotnom delovanju estrogena i progesterona na ekspresiju  $\alpha_1$ -AR na timocitima, budući da je pokazano da progesteron dovodi do smanjenja ekspresije  $\alpha_1$ -AR u tkivu uterusa (Williams i Lefkovitz, 1977). Drugim rečima, može se pretpostaviti da je nepromenjena ekspresija  $\alpha_{1B}$ -AR na timocitima krajnji rezultat uklanjanja ova dva hormona iz cirkulacije koji imaju suprotno delovanje na ekspresiju  $\alpha_1$ -AR. Budući da je u timusu ovarijektomisanih životinja smanjena koncentracija noradrenalina može se pretpostaviti da kod ovih životinja dolazi do smanjenja efikasnosti  $\alpha_1$ -AR posredovane regulacije diferencijacije/sazrevanja timocita. Povećana proliferacija najnezrelijih CD3-timocita u kulturi timocita izolovanih iz ovarijektomisanih životinja u poređenju sa kontrolnim životinjama u kontekstu podataka da 14-dnevni tretman antagonistom  $\alpha_1$ -AR, kod pacova, dovodi do povećanja ukupnog broja timocita usled povećane proliferacije najnezrelijih (CD3-) timocita (Pešić i sar., 2009; Laposavić i sar., 2010),

---

mogla, bi se generalno, pripisati smanjenoj efikasnosti delovanja noradrenalina posredstvom  $\alpha_1$ -AR. Međutim, imajući u vidu da prethodno pomenuti tretman antagonistom  $\alpha_1$ -AR, kod pacova, pored povećane proliferacije najnezrelijih (CD3-) dovodi i favorizovanog linijskog usmeravanja timocita ka ćelijama CD4+CD8-TCR $\alpha\beta^{++}$  fenotipa (Pešić i sar., 2009; Leposavić i sar., 2010), izostanak linijskog usmeravanja timocita ka ćelijama CD4+CD8-TCR $\alpha\beta^{++}$  fenotipa ukazuje na dalju potrebu ispitivanja afiniteta  $\alpha_1$ -AR za noradrenalin i efikasnosti intraćelijskih puteva prenosa signala u timocitima 11 meseci starih ovarijektomisanih životinja. Budući da kateholamini svoj uticaj na timopoezu ostvaruju ne samo direktnim delovanjem na timocite, nego i indirektnim delovanjem na ćelije timusne strome, za potpuno sagledavanje značaja smanjene koncentracije noradrenalina u timusu ovarijektomisanih životinja na  $\alpha_1$ -AR posredovanu modulaciju diferencijacije/sazrevanja timocita bilo bi neophodno istražiti i promene u ekspresiji i efikasnosti prenosa signala posredstvom  $\alpha_1$ -AR i na ćelijama timusne strome.

Na osnovu prethodno navedenih nalaza može se zaključiti da je povećanje efikasnosti timopoeze kod ovarijektomisanih životinja delimično ostvareno promenama u modulatornom delovanju kateholamina na timopoezu, koje se ogledaju u smanjenoj efikasnosti njihovog delovanja posredstvom  $\beta_2$ -AR (Šema 2). U skladu sa ovim opažanjem, kateholamini bi se mogli posmatrati kao medijatori delovanja hormona jajnika u timusu. U prilog ovoj tezi govore podaci o ovakvom, posrednom, delovanju hormona jajnika u drugim organima (Wilson i Davies, 2007).



Šema 2. Šematski prikaz efekata ovarijektomije u uzrastu kada je involucija timusa uznapređovala na diferencijaciju/sazrevanje timocita i fenotipske karakteristike T-limfocita periferne krvi i slezine ženki pacova.

Uklanjanje jajnika u uzrastu od 10 meseci, kada su involutivne promene timusa uznapređovale, kod 11 meseci starih ovarijektomisanih životinja dovodi do: a) delimične regeneracije timusne epitelne komponente, uz istovremenu aktivaciju mehanizama negativne povratne sprege koji ograničavaju ekspanziju subpopulacija timusnih epitelnih ćelija koje sekretuju IL-6 i, posledično, dovode do smanjenja nivoa mRNA za ovaj citokin u tkivu timusa; b) povećanog stvaranja T-limfocita, uključujući i ćelije CD4+CD25+FoxP3+ i CD161+TCRαβ+ fenotipa, što se manifestuje povećanjem broja svežih timusnih emigranata (engl. recent thymic emigrants, RTE) CD4+ i CD8+ fenotipa u perifernoj krvi i slezini ovih

životinja; c) aktivacije intratimusnih mehanizama negativne povratne sprege usled povećane efikasnosti timopoeze i povećanog broja timocita koji su „prošli“  $\beta$ -selekciju, i posledično smanjenja ekspresije gena za IL-7, što usporavanjem diferencijacije najnezrelijih, CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - timocita ograničava efikasnost timopoeze. Povećanje timopoeze kod ovarijektomisanih životinja se najverovatnije, ostvaruje: 1) povećanjem ulaska, proliferacije i diferencijacije progenitorskih frakcija subpopulacije timocita CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - fenotipa; 2) povećanjem efikasnosti pozitivne, a smanjenjem efikasnosti negativne selekcije, makar delimično usled povećane gustine ekspresije Thy-1 molekula (kao regulatora visine selekcionog „praga“ timocita) na timocitima koji ulaze u procese selekcije, najverovatnije usled smanjene koncentracije noradrenalina i gustine  $\beta_2$ -adrenergičkih receptora ( $\beta_2$ -AR) na površini timocita; 3) ubrzanim sazrevanjem i emigracijom novoformiranih T-ćelija iz timusa. KMZ, kortiko-medularna zona;

---

\* \* \*

Treba istaći da bi promene u koncentraciji hormona jajnika, bilo da su izazvane jednokratnim davanjem testosterona u kritičnom neonatalnom periodu ili ovarijektomijom, mogle da utiču na strukturnu organizaciju timusa i posledično efikasnost timopoeze kao glavnog funkcijskog zadatka ovog organa, ne samo modulacijom neurokrinog delovanja noradrenalina iz noradrenergičkih nervnih završetaka i autokrinog/parakrinog delovanja ovog hormona iz timusnih ćelija, već i promenom u oslobađanju i autokrinom/parakrinom delovanju drugih bioaktivnih supstanci (različitih citokina, hemokina, faktora rasta i hormona) iz ćelija timusne strome (Savino i Dardenne, 2000; Savino i sar., 2004).

Konačno, iako su prethodna dva poglavlja ove disertacije bila usmerena na analizu moguće uloge promena u sekreciji hormona jajnika, odnosno njihovog potpunog uklanjanja na proces diferencijacije/sazrevanja timocita, važno je napomenuti da bi, u oba eksperimentalna modela, promene u oslobađanju gonadotropina (folikulostimulirajućeg hormona, FSH i luteinizirajućeg hormona, LH) i prolaktina iz hipofize, u odgovoru na promene u koncentraciji cirkulatornih hormona jajnika, mogle da doprinesu strukturnim i funkcijskim promenama timusa. U prilog ovome idu podaci koji pokazuju da timociti i ćelije strome timusa ispoljavaju receptore za gonadotropine i prolaktin (Batanero i sar., 1992; de Leeuw i sar., 1992; Carreno i sar., 2005; Yu i sar., 2010), kao i da ovi hormoni utiču na proces diferencijacije/sazrevanja timocita kod glodara (de Mello-Coelho i sar., 1997; Carreno i sar., 2005; Yu i sar., 2010). Pored toga, pokazano je da se u timusu sintetiše GnRH (Maier i sar., 1992) i da je sekrecija ovog hormona regulisana mehanizmimom negativne povratne sprege od strane hormona jajnika na sličan način kao i njegova sekrecija u hipotalamusu (Marchetti i sar., 1995, 1996). Naročitu važnost ovom nalazu daju podaci koji pokazuju da timociti ispoljavaju receptore za GnRH (Marchetti i sar., 1989) i da sinteza i ekspresija ovih receptora, zavisi od koncentracije samog GnRH, ali i od estrogena (Jacobson i sar., 1998). Konačno, imajući sve prethodno izneto u vidu, kao i činjenicu da davanje analoga GnRH povećava celularnost timusa i dovodi do promena u procesu diferencijacije/sazrevanja T-ćelija kod miševa i pacova (Rao i sar., 1993; Marchetti i sar., 2000; Leposavić i sar., 2005a), može se pretpostaviti da bi promene u timusu kod

neonatalno androgenizovanih i ovarijektomisanih životinja mogle da odražavaju i pomene u lokalnoj sintezi GnRH.

Na osnovu svih prethodno iznetih podataka, jasno je da do promena u strukturi timusa i procesu diferencijacije/sazrevanja T-ćelija u oba eksperimentalna modela koja su korišćena u ovoj doktorskoj disertaciji, dolazi složenim mehanizmima koji su posledica, ne samo izmenjenog delovanja ili izostanka delovanja hormona jajnika na T-ćelije u razvoju i ćelije koje čine okruženje u kome se ovaj proces odvija (koje uključuju i promene njihove sekretorne aktivnosti i posledično promene moguće lokalne koncentracije timusnih hormona, GnRH, kateholamina, citokina i faktora rasta), već i kao rezultat promena u sekreciji gonadotropina i aktivnosti timusnih noradrenergičkih nervnih vlakana.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci :

I Promene u postnatalnom razvoju H-H-G osovine izazvane jednokratnim davanjem testosterona u kritičnom postnatalnom periodu (neonatalna androgenizacija), koje se ogledaju u odlaganju hormonskih i fenotipskih promena karakterističnih za pubertet, kao i u hiperestrogenemiji uz smanjenu osetljivosti ćelija na delovanje estrogena, hiperandrogenemiji i hipoprogesteronemiji dovode do:

1. promena u kinetici razvoja/involucije timusa, što se u uzrastu od 3 meseca manifestuje kao hipercelularnost organa, povećana efikasnost timopoeze (uključujući, najverovatnije, i povećano stvaranje ćelija Treg i NKT fenotipa) i posledično, povećan broj i procentualna zastupljenost svežih timusnih emigranata CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> fenotipa u perifernoj krvi i slezini;
2. najverovatnije, povećanog ulaska progenitorskih ćelija u timus, njihove povećane proliferacije i ubrzane diferencijacije/sazrevanja, efikasnijeg odvijanja  $\beta$ -selekcije i pozitivne selekcije, a manje efikasne negativne selekcije timocita, favorizovanog usmeravanja diferencijacije/sazrevanja CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocita ka ćelijama CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> fenotipa;
3. defeminizacije/maskulinizacije procesa timopoeze, što se manifestuje favorizovanim linijskim usmeravanjem diferencijacije/sazrevanja CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> timocita ka ćelijama CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>++</sup> fenotipa i, posledično, smanjenim odnosom zastupljenosti CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> svežih timusnih emigranata, kao i CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> T-limfocita u perifernoj krvi i slezini;
4. izostanka promena u relativnoj zastupljenosti TEC i ekspresiji iRNK za IL-6, a smanjenja nivoa iRNK za IL-7 u timusu 3 meseca starih neonatalno androgenizovanih životinja u odnosu na kontrolne

životinje, što bi moglo da ukazuje da je kod ovih životinja (najverovatnije, kao posledica povećane ekspanzije TEC i efikasnosti timopoeze), došlo do pokretanja intratimusnih mehanizama negativne povratne sprege koji ograničavaju porast timusne epitelne komponente i timopoeze;

5. promena u komponentama regulatornog sistema koji čine kateholamini i AR, koje se ogledaju u:
  - većoj koncentraciji noradrenalina u timusu, poreklom iz noradrenergičkih nervnih vlakana, kao i iz limfoidnih i nelimfoidnih ćelija timusa koje sintetišu kateholamine;
  - manjoj gustini ekspresije  $\beta_2$ -AR na površini timocita
  - manjoj efikasnosti modulacije timopoeze posredstvom  $\beta$ -AR, uprkos većoj koncentraciji noradrenalina (verovatno usled smanjene gustine ekspresije  $\beta$ -AR), sudeći prema većoj gustini ekspresije Thy-1 na površini timocita i odgovarajućim promenama u efikasnosti procesa selekcije timocita (povećana pozitivna/smanjena negativna selekcija);

II Uklanjanje jajnika u uzrastu od 10 meseci, kada su involutivne promene timusa jasno izražene, dovodi:

1. ne samo do zaustavljanja progresije involutivnih promena timusa, već i do njihove delimične reverzije, tako da je, u poređenju sa kontrolnim životinjama, kod ovarijektomisanih životinja uzrasta 11 meseci povećana efikasnost timopoeze (uključujući, najverovatnije, i povećano stvaranje ćelija Treg i NKT fenotipa) i, posledično, procenat i ukupan broj svežih timusnih emigranata CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> fenotipa u perifernoj krvi i slezini;
2. do povećanja efikasnosti timopoeze, najverovatnije, usled povećanog ulaska progenitorskih ćelija u timus, njihove povećane proliferacije i ubrzane diferencijacije/sazrevanja, veće efikasnosti pozitivne selekcije, a manje efikasnosti negativne selekcije, što je omogućilo povećanje broja timocita najzrelijeg fenotipa u timusu;



3. do povećanja relativne zastupljenosti TEC, što ukazuje na regenerativno delovanje ovarijektomije na timus, ali i do smanjenja nivoa iRNK za IL-6 i IL-7 u timusu, što sugerše aktivaciju mehanizama negativne povratne sprege koji ograničavaju ekspanziju TEC i timopoezu;
4. promena u komponentama regulatornog sistema koji čine kateholamini i AR, koje se ogledaju u:
  - manjoj koncentraciji noradrenalina u timusu, koji potuče iz noradrenergičkih nervnih vlakana, i nelimfoidnih ćelija timusa koje sintetišu kateholamine;
  - manjoj gustini  $\beta_2$ -AR na površini timocita
  - manjoj efikasnosti modulacije timopoeze posredstvom  $\beta$ -AR, sudeći prema većoj gustini Thy-1 na površini timocita i odgovarajućim promenama u efikasnosti procesa selekcije timocita (povećana pozitivna/smanjena negativna selekcija).

Generalno, rezultati prikazani u ovoj disertaciji, u sklopu nalaza drugih autora, ukazuju da kod pacova: 1) postoji međuzavisnosti u ontogenetskom razvoju H-H-G osovine i timusa; 2) da neonatalna androgenizacija menja postnatalni razvoj timusa, obezbeđujući veći maksimalni rast organa, i odlaže, ali najverovatnije ne sprečava involuciju timusa; 3) uklanjanje jajnika, najverovatnije, dovodi do tranzitorne reverzije uznapredovalih involutivnih promena u timusu, i sledstveno efikasnije timopoeze i 4) u samom timusu postoje regulatorni mehanizmi negativne povratne sprege koji ograničavaju ekspanziju pojedinih subpopulacija TEC (subpopulacija koje sekretuju IL-6) i promene u efikasnosti timopoeze, koje nastaju u uslovima promenjene sekretorne aktivnosti H-H-G osovine.

---

## 7. LITERATURA

- Abo, T. 2001. Extrathymic pathways of T cell differentiation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 49, 81.
- Agosti, V., Corbacioglu, S., Ehlers, I., Waskow, C., Sommer, G., Berrozpe, G., Kissel, H., Tucker, C.M., Manova, K., Moore, M.A., Rodewald, H.R., Besmer, P. 2004. Critical role for Kit-mediated Src kinase but not PI 3-kinase signaling in pro T and pro B cell development. *J Exp Med* 199, 867.
- Agus, D.B., Surh, C.D., Sprent, J. 1991. Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J Exp Med* 173, 1039.
- Akashi, K., Kondo, M., Weissman, I.L. 1998. Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol Rev* 165, 13.
- Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M., Matsumoto, M., Nitta, T., Takahama, Y., Inoue, J. 2008. The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* 29, 423.
- Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., Bhandoola, A. 2003. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* 4, 168.
- Alves, N.L., Huntington, N.D., Mention, J.J., Richard-Le Goff, O., Di Santo, J.P. 2010. Cutting Edge: a thymocyte-thymic epithelial cell cross-talk dynamically regulates intrathymic IL-7 expression in vivo. *J Immunol* 184, 5949.
- Alves, N.L., van Leeuwen, E.M., Derks, I.A., van Lier, R.A. 2008. Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling. *J Immunol* 180, 5201.
- Anderson, G., Jenkinson, E.J., Moore, N.C., Owen, J.J. 1993. MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature* 362, 70.
- Anderson, G., Jenkinson, E.J., Rodewald, H.R. 2009. A roadmap for thymic epithelial cell development. *Eur J Immunol* 39, 1694.
- Anderson, G., Lane, P.J., Jenkinson, E.J. 2007. Generating intrathymic

- microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol* 7, 954.
- Anderson, M., Anderson, S.K., Farr, A.G. 2000. Thymic vasculature: organizer of the medullary epithelial compartment? *Int Immunol* 12, 1105.
- Anderson, M.K., Hernandez-Hoyos, G., Diamond, R.A., Rothenberg, E.V. 1999. Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development* 126, 3131.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., Mathis, D. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395.
- Andrew, D., Aspinall, R. 2002. Age-associated thymic atrophy is linked to a decline in IL-7 production. *Exp Gerontol* 37, 455.
- Anglin, J.C., Brooks, V.L. 2003. Tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter in sympathetic ganglia of female rats vary with reproductive state. *Auton Neurosci* 105, 8.
- Ansar Ahmed, S., Penhale, W.J., Talal, N. 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol.* 121:531-551.
- Arai, Y., Matsumoto, A., Nishizuka, M. 1986. Synaptogenesis and neuronal plasticity to gonadal steroids: implication for the development of sexual dimorphism in the neuroendocrin brain, Springer, Berlin, 291 pp.
- Ardavin, C. 1997. Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 18, 350.
- Arner, P. 2005. Effects of testosterone on fat cell lipolysis. Species differences and possible role in polycystic ovarian syndrome. *Biochimie* 87, 39.
- Artico, M., Cavallotti, C., Cavallotti, D. 2002. Adrenergic nerve fibres and mast cells: correlation in rat thymus. *Immunol Lett* 84, 69.
- Aspinall, R. 1997. Age-associated thymic atrophy in the mouse is due to a deficiency affecting rearrangement of the TCR during intrathymic T cell development. *J Immunol* 158, 3037.
- Aspinall, R., Andrew, D. 2001. Age-associated thymic atrophy is not associated with a deficiency in the CD44(+)CD25(-)CD3(-)CD4(-)CD8(-) thymocyte population. *Cell Immunol* 212, 150.

- Aw, D., Silva, A.B., Maddick, M., von Zglinicki, T., Palmer, D.B. 2008. Architectural changes in the thymus of aging mice. *Aging Cell* 7, 158.
- Azooz, O.G., Farthing, M.J., Savage, M.O., Ballinger, A.B. 2001. Delayed puberty and response to testosterone in a rat model of colitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R1483.
- Baldwin, T.A., Hogquist, K.A., Jameson, S.C. 2004. The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus. *J Immunol* 173, 6515.
- Baltgalvis, K.A., Greising, S.M., Warren, G.L., Lowe, D.A. 2010. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS One* 5, e10164.
- Barraclough, C.A. 1972. Hormones and the ontogenesis of pituitary regulating mechanisms. *UCLA Forum Med Sci* 15, 149.
- Barria, A., Leyton, V., Ojeda, S.R., Lara, H.E. 1993. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 133, 2696.
- Batanero, E., de Leeuw, F.E., Jansen, G.H., van Wichen, D.F., Huber, J., Schuurman, H.J. 1992. The neural and neuro-endocrine component of the human thymus. II. Hormone immunoreactivity. *Brain Behav Immun* 6, 249.
- Bell, J.J., Bhandoola, A. 2008. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 452, 764.
- Bellinger, D.L., Felten, S.Y., Ackerman, K.D., Lorton, D., Madden, K.S., Felten, D.L. 1992. Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid organs during development, aging, and in immune disease. Amenta (Ed.), *Aging of the Autonomic Nervous System*, CRC Press, Boca Raton, 243.
- Bellinger, D.L., Felten, S.Y., Felten, D.L. 1988. Maintenance of noradrenergic sympathetic innervation in the involuted thymus of the aged Fischer 344 rat. *Brain Behav Immun* 2, 133.
- Bendelac, A. 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* 182, 2091.
- Bendelac, A., Savage, P.B., Teyton, L. 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25, 297.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L.,

- Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., Ochs, H.D. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27, 20.
- Bertho, J.M., Demarquay, C., Moulian, N., Van Der Meeren, A., Berrih-Aknin, S., Gourmelon, P. 1997. Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell Immunol* 179, 30.
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S. 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2496.
- Berzins, S.P., Boyd, R.L., Miller, J.F. 1998. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *J Exp Med* 187, 1839.
- Berzins, S.P., McNab, F.W., Jones, C.M., Smyth, M.J., Godfrey, D.I. 2006. Long-term retention of mature NK1.1+ NKT cells in the thymus. *J Immunol* 176, 4059.
- Berzofsky, J.A., Terabe, M. 2008. NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis. *J Immunol* 180, 3627.
- Besedovsky, H.O., del Rey, A. 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17, 64.
- Besedovsky, H.O., Sorkin, E. 1974. Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* 249, 356.
- Bettini, M.L., Vignali, D.A. 2010. Development of thymically derived natural regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci* 1183, 1.
- Bhakta, N.R., Lewis, R.S. 2005. Real-time measurement of signaling and motility during T cell development in the thymus. *Semin Immunol* 17, 411.
- Biegel, L.B., Cook, J.C., Hurtt, M.E., O'Connor, J.C. 1998. Effects of 17 beta-estradiol on serum hormone concentrations and estrous cycle in female Crl:CD BR rats: effects on parental and first generation rats. *Toxicol Sci* 44, 143.
- Blacker, C.M., Ataya, K.M., Savoy-Moore, R.T., Subramanian, M.G., Mutchnick, M.G., Dunbar, J.C. 1991. The gonadotropin-releasing hormone agonist leuprolide affects the thymus and other non-reproductive systems of female rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 125, 581.

- Bleul, C.C., Corbeaux, T., Reuter, A., Fisch, P., Monting, J.S., Boehm, T. 2006. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 441, 992.
- Bodey, B., Bodey, B., Siegel, S.E., Kaiser, H.E. 1997. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. *In Vivo* 11, 421.
- Boehm, T., Bleul, C.C. 2006. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends Immunol* 27, 477.
- Boehm, T., Nehls, M., Kyewski, B. 1995. Transcription factors that control development of the thymic microenvironment. *Immunol Today* 16, 555.
- Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K., Bleul, C.C. 2003. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med* 198, 757.
- Bommhardt, U., Beyer, M., Hunig, T., Reichardt, H.M. 2004. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci* 61, 263.
- Borowski, C., Martin, C., Gounari, F., Haughn, L., Aifantis, I., Grassi, F., von Boehmer, H. 2002. On the brink of becoming a T cell. *Curr Opin Immunol* 14, 200.
- Bouso, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S., Robey, E. 2002. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296, 1876.
- Boyd, R.L., Tucek, C.L., Godfrey, D.I., Izon, D.J., Wilson, T.J., Davidson, N.J., Bean, A.G., Ladyman, H.M., Ritter, M.A., Hugo, P. 1993. The thymic microenvironment. *Immunol Today* 14, 445.
- Brown, N., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S. 2006. Diethylstilbestrol alters positive and negative selection of T cells in the thymus and modulates T-cell repertoire in the periphery. *Toxicol Appl Pharmacol* 212, 119.
- Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guinter, T.I., Yamashita, Y., Sharrow, S.O., Singer, A. 2000. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 13, 59.
- Brunelli, R., Frasca, D., Baschieri, S., Spano, M., Fattorossi, A., Mosiello, L.F., D'Amelio, R., Zichella, L., Doria, G. 1992. Changes in thymocyte subsets induced by estradiol administration or pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 650, 109.
- Brunet, I., Weini, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz,

- A., Holt, C. 2005. The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438, 94.
- Budd, R.C., Mixter, P.F. 1995. The origin of CD4-CD8-TCR alpha beta+ thymocytes: a model based on T-cell receptor avidity. *Immunol Today* 16, 428.
- Bukovsky, A., Ayala, M.E., Dominguez, R., Keenan, J.A., Wimalasena, J., Elder, R.F., Caudle, M.R. 2002. Changes of ovarian interstitial cell hormone receptors and behavior of resident mesenchymal cells in developing and adult rats with steroid-induced sterility. *Steroids*. 67:277-289.
- Bukovsky, A., Ayala, M.E., Dominguez, R., Keenan, J.A., Wimalasena, J., McKenzie, P.P.; Caudle, M.R. 2000. Postnatal androgenization induces premature aging of rat ovaries. *Steroids*. 65:190-205.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.W., Vegoe, A.L., Hsieh, C.S., Jenkins, M.K., Farrar, M.A. 2008. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28, 112.
- Butts, C.L., Shukair, S.A., Duncan, K.M., Bowers, E., Horn, C., Belyavskaya, E., Tonelli, L., Sternberg, E.M. 2007. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol* 19, 287.
- Calzolari, A. 1898. Recherches experimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et celle des testicules. *Arch Ital Biol* 30, 71.
- Cao, W.M., Murao, K., Imachi, H., Hiramane, C., Abe, H., Yu, X., Dobashi, H., Wong, N.C., Takahara, J., Ishida, T. 2004. Phosphatidylserine receptor cooperates with high-density lipoprotein receptor in recognition of apoptotic cells by thymic nurse cells. *J Mol Endocrinol* 32, 497.
- Capone, M., Hockett, R.D., Jr., Zlotnik, A. 1998. Kinetics of T cell receptor beta , gamma , and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44+CD25+ Pro-T thymocytes. *PNAS* 95, 12522.
- Capri, M., Quaglino, D., Verzella, G., Monti, D., Bonafè, M., Cossarizza, A., Troiano, L., Zecca, L., Pasquali-Ronchetti, I., Franceschi, C. 2000. A cytofluorimetric study of T lymphocyte subsets in rat lymphoid tissues (thymus, lymph nodes) and peripheral blood: a continuous remodelling during the first year of life. *Exp*

- Gerontol 35, 613.
- Carley, M.E., Rickard, D.J., Gebhart, J.B., Webb, M.J., Podratz, K.C., Spelsberg, T.C. 2003. Distribution of estrogen receptors alpha and beta mRNA in mouse urogenital tissues and their expression after oophorectomy and estrogen replacement. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 14, 141.
- Carreno, P.C., Sacedon, R., Jimenez, E., Vicente, A., Zapata, A.G. 2005. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J Neuroimmunol* 160, 135.
- Cavallotti, C., Artico, M., Cavallotti, D. 1999. Occurrence of adrenergic nerve fibers and of noradrenaline in thymus gland of juvenile and aged rats. *Immunol Lett* 70, 53.
- Cenci, S., Toraldo, G., Weitzmann, M.N., Roggia, C., Gao, Y., Qian, W.P., Sierra, O., Pacifici, R. 2003. Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10405.
- Cikota, B., Janezic, A., Magic, Z. 2002. Quantification of gene expression using the polymerase chain reaction. *Vojnosanit Pregl* 59, 551.
- Clarke, A.G., Kendall, M.D. 1994. The thymus in pregnancy: the interplay of neural, endocrine and immune influences. *Immunol Today* 15, 545.
- Colombara, M., Antonini, V., Riviera, A.P., Mainiero, F., Strippoli, R., Merola, M., Fracasso, G., Poffe, O., Brutti, N., Tridente, G., Colombatti, M., Ramarli, D. 2005. Constitutive activation of p38 and ERK1/2 MAPKs in epithelial cells of myasthenic thymus leads to IL-6 and RANTES overexpression: effects on survival and migration of peripheral T and B cells. *J Immunol* 175, 7021.
- Crowe, N.Y., Coquet, J.M., Berzins, S.P., Kyparissoudis, K., Keating, R., Pellicci, D.G., Hayakawa, Y., Godfrey, D.I., Smyth, M.J. 2005. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med* 202, 1279.
- Csaba, G., Bohdaneczky, E., Kovacs, P. 1988. Role of the time factor in the development of hormonal imprinting of insulin receptors in Chang liver cell cultures. *Acta Physiol Hung* 72, 35.
- Csaba, G., Inczeffi-Gonda, A. 2002. Effect of a single treatment (imprinting) with genistein or combined treatment with genistein+benzpyrene on the binding



- capacity of glucocorticoid and estrogen receptors of adult rats. *Hum Exp Toxicol* 21, 231.
- Curotto de Lafaille, M.A., Lafaille, J.J. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30, 626.
- Čolić, M., Pejnović, N., Kataranovski, M., Stojanović, N., Terzić, T., Dujić, A. 1991. Rat thymic epithelial cells in culture constitutively secrete IL-1 and IL-6. *Int Immunol* 3, 1165.
- Da Silva, J.A. 1999. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 876, 102.
- Dakic, A., Shao, Q.X., D'Amico, A., O'Keeffe, M., Chen, W.F., Shortman, K., Wu, L. 2004. Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J Immunol* 172, 1018.
- Dardenne, M., Savino, W. 1994. Control of thymus physiology by peptidic hormones and neuropeptides. *Immunol Today* 15, 518.
- Dave, V.P., Allman, D., Wiest, D.L., Kappes, D.J. 1999. Limiting TCR expression leads to quantitative but not qualitative changes in thymic selection. *J Immunol* 162, 5764.
- de Fougères Nunn, E., Greenstein, B., Khamashta, M., Hughes, G.R. 1999. Evidence for sexual dimorphism of estrogen receptors in hypothalamus and thymus of neonatal and immature Wistar rats. *Int J Immunopharmacol* 21, 869.
- de Leeuw, F.E., Jansen, G.H., Batanero, E., van Wichen, D.F., Huber, J., Schuurman, H.J. 1992. The neural and neuro-endocrine component of the human thymus. I. Nerve-like structures. *Brain Behav Immun* 6, 234.
- de Mello-Coelho, V., Villa-Verde, D.M., Dardenne, M., Savino, W. 1997. Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol* 76, 39.
- De Pergola, G., Giagulli, V.A., Garruti, G., Cospite, M.R., Giorgino, F., Cignarelli, M., Giorgino, R. 1991. Low dehydroepiandrosterone circulating levels in premenopausal obese women with very high body mass index. *Metabolism* 40, 187.
- De Waal, E.J., Rademakers, L.H. 1997. Heterogeneity of epithelial cells in the rat thymus. *Microsc Res Tech* 38, 227.

- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2, 1032.
- DiPaolo, R.J., Shevach, E.M. 2009. CD4<sup>+</sup> T-cell development in a mouse expressing a transgenic TCR derived from a Treg. *Eur J Immunol* 39, 234.
- Donskoy, E., Goldschneider, I. 2003. Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit the adult mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J Immunol* 170, 3514.
- Dorner, G., Eckert, R., Hinz, G. 1980. Androgen-dependent sexual dimorphism of the immune system. *Endokrinologie*. 76:112-114.
- Dosiou, C., Hamilton, A.E., Pang, Y., Overgaard, M.T., Tulac, S., Dong, J., Thomas, P., Giudice, L.C. 2008. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J Endocrinol* 196, 67.
- Douek, D.C., Corley, K.T., Zal, T., Mellor, A., Dyson, P.J., Altmann, D.M. 1996. Negative selection by endogenous antigen and superantigen occurs at multiple thymic sites. *Int Immunol* 8, 1413.
- Douek, D.C., McFarland, R.D., Keiser, P.H., Gage, E.A., Massey, J.M., Haynes, B.F., Polis, M.A., Haase, A.T., Feinberg, M.B., Sullivan, J.L., Jamieson, B.D., Zack, J.A., Picker, L.J., Koup, R.A. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396, 690.
- Egawa, T., Eberl, G., Taniuchi, I., Benlagha, K., Geissmann, F., Hennighausen, L., Bendelac, A., Littman, D.R. 2005. Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity* 22, 705.
- Egerton, M., Scollay, R., Shortman, K. 1990. Kinetics of Mature T-Cell Development in the Thymus. *PNAS* 87, 2579.
- Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P., Vizi, E.S. 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52, 595.
- Ellmann, S., Sticht, H., Thiel, F., Beckmann, M.W., Strick, R., Strissel, P.L. 2009.

- Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 66, 2405.
- Erlandsson, M.C., Ohlsson, C., Gustafsson, J.A., Carlsten, H. 2001. Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus. *Immunology* 103, 17.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207.
- Falk, I., Biro, J., Kohler, H., Eichmann, K. 1996. Proliferation kinetics associated with T cell receptor-beta chain selection of fetal murine thymocytes. *J Exp Med* 184, 2327.
- Fehervari, Z., Sakaguchi, S. 2004. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 16, 203.
- Felten, D.L., Felten, S.Y., Carlson, S.L., Olschowka, J.A., Livnat, S. 1985. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol* 135, 755s.
- Fitzpatrick, F.T., Greenstein, B.D. 1987. Effects of various steroids on the thymus, spleen, ventral prostate and seminal vesicles in old orchidectomized rats. *J Endocrinol* 113, 51.
- Fletcher, A.L., Lowen, T.E., Sakkal, S., Reiseger, J.J., Hammett, M.V., Seach, N., Scott, H.S., Boyd, R.L., Chidgey, A.P. 2009. Ablation and regeneration of tolerance-inducing medullary thymic epithelial cells after cyclosporine, cyclophosphamide, and dexamethasone treatment. *J Immunol* 183, 823.
- Foss, D.L., Donskoy, E., Goldschneider, I. 2001. The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med* 193, 365.
- Frasor, J., Danes, J.M., Komm, B., Chang, K.C., Lyttle, C.R., Katzenellenbogen, B.S. 2003a. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 144, 4562.
- Frasor, J., Barnett, D.H., Danes, J.M., Hess, R., Parlow, A.F., Katzenellenbogen, B.S.

- 2003b. Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinology* 144, 3159.
- Freitas, A.A., Rocha, B. 2000. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol* 18, 83.
- Fry, T.J., Mackall, C.L. 2002. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 99, 3892.
- Fujii-Hanamoto, H., Grossman, C.J., Roselle, G.A., Mendenhall, C.L., Seiki, K. 1990. Nuclear progesterin receptors in rat thymic tissue. *Thymus* 15, 31.
- Fujii-Hanamoto, H., Seiki, K., Sakabe, K., Ogawa, H. 1985. Progesterin receptor in the thymus of ovariectomized immature rats. *J Endocrinol* 107, 223.
- Gabler, J., Arnold, J., Kyewski, B. 2007. Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* 37, 3363.
- Galien, R., Garcia, T. 1997. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res* 25, 2424.
- Gapin, L., Matsuda, J.L., Surh, C.D., Kronenberg, M. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2, 971.
- George, A.J., Ritter, M.A. 1996. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today* 17, 267.
- George, F.W., Ojeda, S.R. 1982. Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. *Endocrinology* 111, 522.
- Gerall, A.A., Kenney, A.M. 1970. Neonatally androgenized females' responsiveness to estrogen and progesterone. *Endocrinology* 87, 560.
- Gerall, A.A., Stone, L.S., Hitt, J.C. 1972. Neonatal androgen depresses female responsiveness to estrogen. *Physiol Behav* 8, 17.
- Globerson, A., Effros, R.B. 2000. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today* 21, 515.
- Godfrey, D.I., Berzins, S.P. 2007. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol* 7, 505.
- Godfrey, D.I., Hammond, K.J., Poulton, L.D., Smyth, M.J., Baxter, A.G. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21, 573.
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., Zlotnik, A. 1993. A developmental pathway

- involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* 150, 4244.
- Godfrey, D.I., Stankovic, S., Baxter, A.G. 2010. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* 11, 197.
- Goldrath, A.W., Bevan, M.J. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255.
- Goldrath, A.W., Bevan, M.J. 1999. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* 11, 183.
- Goldschneider, I. 2006. Cyclical mobilization and gated importation of thymocyte progenitors in the adult mouse: evidence for a thymus-bone marrow feedback loop. *Immunol Rev* 209, 58.
- Gommeaux, J., Gregoire, C., Nguessan, P., Richelme, M., Malissen, M., Guerder, S., Malissen, B., Carrier, A. 2009. Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes. *Eur J Immunol* 39, 956.
- Gorski, R.A. 1971. Sexual differentiation of the hypothalamus, CC Thomas Publ, Springfield, 60 pp.
- Gould, K.A., Shull, J.D., Gorski, J. 2000. DES action in the thymus: inhibition of cell proliferation and genetic variation. *Mol Cell Endocrinol* 170, 31.
- Gourdy, P., Araujo, L.M., Zhu, R., Garmy-Susini, B., Diem, S., Laurell, H., Leite-de-Moraes, M., Dy, M., Arnal, J.F., Bayard, F., Herbelin, A. 2005. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-gamma production by invariant natural killer T cells. *Blood* 105, 2415.
- Gray, D., Abramson, J., Benoist, C., Mathis, D. 2007. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J Exp Med* 204, 2521.
- Gray, D.H., Seach, N., Ueno, T., Milton, M.K., Liston, A., Lew, A.M., Goodnow, C.C., Boyd, R.L. 2006. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* 108, 3777.
- Gray, D.H., Tull, D., Ueno, T., Seach, N., Classon, B.J., Chidgey, A., McConville, M.J., Boyd, R.L. 2007. A unique thymic fibroblast population revealed by the monoclonal antibody MTS-15. *J Immunol* 178, 4956.
- Greenstein, B.D., Fitzpatrick, F.T., Adcock, I.M., Kendall, M.D., Wheeler, M.J. 1986.

- Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone. *J Endocrinol* 110, 417.
- Grossman, C.J. 1985. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 227, 257.
- Grueter, B., Petter, M., Egawa, T., Laule-Kilian, K., Aldrian, C.J., Wuerch, A., Ludwig, Y., Fukuyama, H., Wardemann, H., Waldschuetz, R., Moroy, T., Taniuchi, I., Steimle, V., Littman, D.R., Ehlers, M. 2005. Runx3 regulates integrin alpha E/CD103 and CD4 expression during development of CD4-/CD8+ T cells. *J Immunol* 175, 1694.
- Guillamon, A., de Blas, M.R., Segovia, S. 1988. Effects of sex steroids on the development of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res* 468, 306.
- Gulino, A., Screpanti, I., Torrisi, M.R., Frati, L. 1985. Estrogen receptors and estrogen sensitivity of fetal thymocytes are restricted to blast lymphoid cells. *Endocrinology* 117, 47.
- Gumperz, J.E., Miyake, S., Yamamura, T., Brenner, M.B. 2002. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 195, 625.
- Haas, J., Fritzsching, B., Trubswetter, P., Korporal, M., Milkova, L., Fritz, B., Vobis, D., Krammer, P.H., Suri-Payer, E., Wildemann, B. 2007. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol* 179, 1322.
- Hammerling, G.J., Schonrich, G., Momburg, F., Auphan, N., Malissen, M., Malissen, B., Schmitt-Verhulst, A.M., Arnold, B. 1991. Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance: studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen. *Immunol Rev* 122, 47.
- Harman, B.C., Jenkinson, E.J., Anderson, G. 2003. Entry into the thymic microenvironment triggers Notch activation in the earliest migrant T cell progenitors. *J Immunol* 170, 1299.
- He, X., Park, K., Kappes, D.J. 2010. The role of ThPOK in control of CD4/CD8 lineage commitment. *Annu Rev Immunol* 28, 295.
- Head, G.M., Downing, J.E., Brucker, C., Mentlein, R., Kendall, M.D. 1999. Rapid progesterone actions on thymulin-secreting epithelial cells cultured from rat

- thymus. *Neuroimmunomodulation* 6, 31.
- Hedger, M.P., Drummond, A.E., Robertson, D.M., Risbridger, G.P., de Kretser, D.M. 1989. Inhibin and activin regulate [<sup>3</sup>H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 61, 133.
- Hedger, M.P., Phillips, D.J., de Kretser, D.M. 2000. Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1beta or interleukin 6 in vitro. *Cytokine* 12, 595.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strom, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J.A. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87, 905.
- Herbison, A.E., Simonian, S.X., Thanky, N.R., Bicknell, R.J. 2000. Oestrogen modulation of noradrenaline neurotransmission. *Novartis Found Symp* 230, 74.
- Hernandez-Hoyos, G., Anderson, M.K., Wang, C., Rothenberg, E.V., Alberola-Ila, J. 2003. GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation. *Immunity* 19, 83.
- Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J.M., Takayanagi, H., Yokota, Y., Yamada, H., Yoshikai, Y., Inoue, J., Akiyama, T., Takahama, Y. 2008. The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity* 29, 438.
- Hince, M., Sakkal, S., Vlahos, K., Dudakov, J., Boyd, R., Chidgey, A. 2008. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution. *Cell Immunol* 252, 122.
- Hirokawa, K., Utsuyama, M., Sado, T. 1989. Immunohistological analysis of immigration of thymocyte-precursors into the thymus: evidence for immigration of peripheral T cells into the thymic medulla. *Cell Immunol* 119, 160.
- Hoffman-Goetz, L., Fietsch, C.L., McCutcheon, D., Duerrstein, L. 2001. Effect of 17beta-estradiol and voluntary exercise on lymphocyte apoptosis in mice. *Physiol Behav* 74, 653.
- Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., Jameson, S.C. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5, 772.
- Honey, K., Nakagawa, T., Peters, C., Rudensky, A. 2002. Cathepsin L regulates CD4+

- T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J Exp Med* 195, 1349.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057.
- Hori, S., Sakaguchi, S. 2004. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 6, 745.
- Hosseinzadeh, H., Goldschneider, I. 1993. Recent thymic emigrants in the rat express a unique antigenic phenotype and undergo post-thymic maturation in peripheral lymphoid tissues. *J Immunol* 150, 1670.
- Houston, E.G., Jr., Higdon, L.E., Fink, P.J. 2011. Recent thymic emigrants are preferentially incorporated only into the depleted T-cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5366.
- Houston, E.G., Jr., Nechanitzky, R., Fink, P.J. 2008. Cutting edge: Contact with secondary lymphoid organs drives postthymic T cell maturation. *J Immunol* 181, 5213.
- Huang, H., Patel, D.D., Manton, K.G. 2005. The immune system in aging: roles of cytokines, T cells and NK cells. *Front Biosci* 10, 192.
- Hueber, A.O., Bernard, A.M., Battari, C.L., Marguet, D., Massol, P., Foa, C., Brun, N., Garcia, S., Stewart, C., Pierres, M., He, H.T. 1997. Thymocytes in Thy-1<sup>-/-</sup> mice show augmented TCR signaling and impaired differentiation. *Curr Biol* 7, 705.
- Hünig, T., Torres-Nagel, N., Mehling, B., Park, H.J., Herrmann, T. 2001. Thymic development and repertoire selection: the rat perspective. *Immunol Rev* 184, 7.
- Hutchison, J.B. 1997. Gender-specific steroid metabolism in neural differentiation. *Cell Mol Neurobiol* 17, 603.
- Inaba, K., Inaba, M., Kinashi, T., Tashiro, K., Witmer-Pack, M., Crowley, M., Kaplan, G., Valinsky, J., Romani, N., Ikehara, S., et al. 1988. Macrophages phagocytose thymic lymphocytes with productively rearranged T cell receptor alpha and beta genes. *J Exp Med* 168, 2279.
- Ito, Y., Arai, S., van Oers, N.S., Aifantis, I., von Boehmer, H., Miyazaki, T. 2002. Positive selection by the pre-TCR yields mature CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 169:4913-4919.
- Iwai, T., Tomita, Y., Okano, S., Shimizu, I., Yasunami, Y., Kajiwara, T., Yoshikai, Y.,



- Taniguchi, M., Nomoto, K., Yasui, H. 2006. Regulatory roles of NKT cells in the induction and maintenance of cyclophosphamide-induced tolerance. *J Immunol* 177, 8400.
- Jacobson, J.D., Crofford, L.J., Sun, L., Wilder, R.L. 1998. Cyclical expression of GnRH and GnRH receptor mRNA in lymphoid organs. *Neuroendocrinology* 67, 117.
- Jaeckel, E., Kretschmer, K., Apostolou, I., von Boehmer, H. 2006. Instruction of Treg commitment in peripheral T cells is suited to reverse autoimmunity. *Semin Immunol* 18, 89.
- Jenkinson, W.E., Rossi, S.W., Parnell, S.M., Jenkinson, E.J., Anderson, G. 2007. PDGFRalpha-expressing mesenchyme regulates thymus growth and the availability of intrathymic niches. *Blood* 109, 954.
- Jeong, H., Kim, M.S., Kwon, J., Kim, K.S., Seol, W. 2006. Regulation of the transcriptional activity of the tyrosine hydroxylase gene by androgen receptor. *Neurosci Lett* 396, 57.
- Josefowicz, S.Z., Rudensky, A. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30, 616.
- Josefsson, E., Bergquist, J., Ekman, R., Tarkowski, A. 1996. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology* 88, 140.
- Jost, A. 1969. *The Extent of Foetal Endocrine Autonomy*, John Wiley & Sons, Ltd., 79 pp.
- Kamath, A.B., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M. 1998. Characterization of phenotypic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on thymocytes in vivo and its effect on apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 150, 117.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9, 1603.
- Kato, J., Onouchi, T., Okinaga, S. 1978. Hypothalamic and hypophysial progesterone receptors: estrogen-priming effect, differential localization, 5alpha-dihydroprogesterone binding, and nuclear receptors. *J Steroid Biochem* 9, 419.
- Kawashima, I., Sakabe, K., Seiki, K., Fujii-Hanamoto, H., Akatsuka, A., Tsukamoto, H.

1991. Localization of sex steroid receptor cells, with special reference to thymulin (FTS)-producing cells in female rat thymus. *Thymus* 18, 79.
- Kaye, J., Vasquez, N.J., Hedrick, S.M. 1992. Involvement of the same region of the T cell antigen receptor in thymic selection and foreign peptide recognition. *J Immunol* 148, 3342.
- Kendall, M.D., Atkinson, B.A., Munoz, F.J., de la Riva, C., Clarke, A.G., von Gaudecker, B. 1994. The noradrenergic innervation of the rat thymus during pregnancy and in the post partum period. *J Anat* 185 ( Pt 3), 617.
- Kendall, M.D., Clarke, A.G. 2000. The thymus in the mouse changes its activity during pregnancy: a study of the microenvironment. *J Anat.* 197 Pt 3:393-411.
- Kenins, L., Gill, J.W., Hollander, G.A., Wodnar-Filipowicz, A. 2010. Flt3 ligand-receptor interaction is important for maintenance of early thymic progenitor numbers in steady-state thymopoiesis. *Eur J Immunol* 40, 81.
- Khan, K.N., Masuzaki, H., Fujishita, A., Kitajima, M., Sekine, I., Matsuyama, T., Ishimaru, T. 2005. Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. *Hum Reprod* 20, 2004.
- Kikuchi, K., Kasai, H., Watanabe, A., Lai, A.Y., Kondo, M. 2008. IL-7 specifies B cell fate at the common lymphoid progenitor to pre-proB transition stage by maintaining early B cell factor expression. *J Immunol* 181, 383.
- Killeen, N. 1997. T-cell regulation: Thy-1 - hiding in full view. *Curr Biol* 7, R774.
- Killeen, N., Irving, B.A., Pippig, S., Zingler, K. 1998. Signaling checkpoints during the development of T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 10, 360.
- Kincade, P.W., Medina, K.L., Payne, K.J., Rossi, M.I., Tudor, K.S., Yamashita, Y., Kouro, T. 2000. Early B-lymphocyte precursors and their regulation by sex steroids. *Immunol Rev* 175, 128.
- Kisielow, P., Teh, H.S., Bluthmann, H., von Boehmer, H. 1988. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335, 730.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., Kyewski, B. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9, 833.

- Klein, L., Kyewski, B. 2000. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr Opin Immunol* 12, 179.
- Klein, L., Roettinger, B., Kyewski, B. 2001. Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance. *Eur J Immunol* 31, 2476.
- Kohler, C., Berkowitz, B.A., Spector, S. 1975. Sex hormones and tyrosine hydroxylase activity in vascular and adrenal tissue. *Endocrinology* 97, 1316.
- Kovacs, W.J., Olsen, J.N. 1998. Sex hormones and immune responses. . *Contemporary Endocrinology: Autoimmune Endocrinopathies* Edited by Robert Volpe Humana Press Inc, Totowa, N.J., 164.
- Kranz, A., Kendall, M.D., von Gaudecker, B. 1997. Studies on rat and human thymus to demonstrate immunoreactivity of calcitonin gene-related peptide, tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y. *J Anat* 191 ( Pt 3), 441.
- Kronenberg, M., Gapin, L. 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2, 557.
- Kuhl, H., Gross, M., Schneider, M., Weber, W., Mehlis, W., Stegmuller, M., Taubert, H.D. 1983. The effect of sex steroids and hormonal contraceptives upon thymus and spleen on intact female rats. *Contraception* 28, 587.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863.
- Kurobe, H., Liu, C., Ueno, T., Saito, F., Ohigashi, I., Seach, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Kitagawa, T., Lipp, M., Boyd, R.L., Takahama, Y. 2006. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* 24, 165.
- Kvetnansky, R., Sabban, E.L., Palkovits, M. 2009. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 89, 535.
- Kydd, R., Lundberg, K., Vremec, D., Harris, A.W., Shortman, K. 1995. Intermediate steps in thymic positive selection. Generation of CD4-8+ T cells in culture from CD4+8+, CD4int8+, and CD4+8int thymocytes with up-regulated levels of TCR-CD3. *J Immunol* 155, 3806.

- Kyewski, B., Derbinski, J., Gotter, J., Klein, L. 2002. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol* 23, 364.
- Kyewski, B., Klein, L. 2006. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24, 571.
- Kyewski, B.A. 1987. Seeding of thymic microenvironments defined by distinct thymocyte-stromal cell interactions is developmentally controlled. *J Exp Med* 166, 520.
- La Cava, A., Van Kaer, L., Fu Dong, S. 2006. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol* 27, 322.
- Lacorazza, H.D., Guevara Patino, J.A., Weksler, M.E., Radu, D., Nikolic-Zugic, J. 1999. Failure of rearranged TCR transgenes to prevent age-associated thymic involution. *J Immunol* 163, 4262.
- LaJevic, M.D., Koduvayur, S.P., Caffrey, V., Cohen, R.L., Chambers, D.A. 2010. Thy-1 mRNA destabilization by norepinephrine a 3' UTR cAMP responsive decay element and involves RNA binding proteins. *Brain Behav Immun* 24, 1078.
- Lan, R.Y., Ansari, A.A., Lian, Z.X., Gershwin, M.E. 2005. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 4, 351.
- Lau, L.L., Spain, L.M. 2000. Altered aging-related thymic involution in T cell receptor transgenic, MHC-deficient, and CD4-deficient mice. *Mech Ageing Dev* 114, 101.
- Law, D.A., Spruyt, L.L., Paterson, D.J., Williams, A.F. 1989. Subsets of thymopoietic rat thymocytes defined by expression of the CD2 antigen and the MRC OX-22 determinant of the leukocyte-common antigen CD45. *Eur J Immunol* 19, 2289.
- Le Campion, A., Lucas, B., Dautigny, N., Leament, S., Vasseur, F., Penit, C. 2002. Quantitative and qualitative adjustment of thymic T cell production by clonal expansion of premigrant thymocytes. *J Immunol* 168, 1664.
- Le Campion, A., Vasseur, F., Penit, C. 2000. Regulation and kinetics of premigrant thymocyte expansion. *Eur J Immunol* 30, 738.
- Lee, P.T., Benlagha, K., Teyton, L., Bendelac, A. 2002. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 195, 637.
- Leposavić, G., Arsenović-Ranin, N., Radojević, K., Kosec, D., Pešić, V., Vidić-Danković, B., Plečaš-Solarović, B., Pilipović, I. 2006. Characterization of

- thymocyte phenotypic alterations induced by long-lasting beta-adrenoceptor blockade in vivo and its effects on thymocyte proliferation and apoptosis. *Mol Cell Biochem* 285, 87.
- Leposavić, G., Karapetrović, B., Obradović, S., Vidić-Dandović, B., Kosec, D. 1996. Differential effects of gonadectomy on the thymocyte phenotypic profile in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 54, 269.
- Leposavić, G., Mičić, M., Ugrešić, N., Bogojević, M., Isaković, K. 1992. Components of sympathetic innervation of the rat thymus during late fetal and postnatal development: histofluorescence and biochemical study. Sympathetic innervation of the rat thymus. *Thymus* 19, 77.
- Leposavić, G., Obradović, S., Kosec, D., Pejčić-Karapetrović, B., Vidić-Danković, B. 2001. In vivo modulation of the distribution of thymocyte subsets by female sex steroid hormones. *Int Immunopharmacol* 1, 1.
- Leposavić, G., Pekić, S., Kosec, D. 2005a. Gonadotropin-releasing hormone agonist administration affects the thymopoiesis in adult female rats independently on gonadal hormone production. *Am J Reprod Immunol* 53, 30.
- Leposavić, G., Pejčić-Karapetrović, B., Kosec, D. 2005b. Neonatal androgenization affects the intrathymic T-cell maturation in rats. *Neuroimmunomodulation* 12, 117.
- Leposavić, G., Pešić, V., Kosec, D., Radojević, K., Arsenović-Ranin, N., Pilipović, I., Perišić, M., Plecaš-Solarović, B. 2006. Age-associated changes in CD90 expression on thymocytes and in TCR-dependent stages of thymocyte maturation in male rats. *Exp Gerontol* 41, 574.
- Leposavić, G., Pešić, V., Stojić-Vukanić, Z., Radojević, K., Arsenović-Ranin, N., Kosec, D., Perišić, M., Pilipović, I. 2010. Age-associated plasticity of alpha1-adrenoceptor-mediated tuning of T-cell development. *Exp Gerontol* 45, 918.
- Leposavić, G., Pilipović, I., Radojević, K., Pešić, V., Perišić, M., Kosec, D. 2008. Catecholamines as immunomodulators: a role for adrenoceptor-mediated mechanisms in fine tuning of T-cell development. *Auton Neurosci* 144, 1.
- Leposavić, G., Radojević, K., Vidić-Danković, B., Kosec, D., Pilipović, I., Perišić, M. 2007. Early postnatal castration affects thymic and thymocyte noradrenaline levels and beta-adrenoceptor-mediated influence on the thymopoiesis in adult

- rats. *J Neuroimmunol* 182, 100.
- Li, J., McMurray, R.W. 2006. Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on immune functions in ovariectomized mice. *Int Immunopharmacol* 6, 1413.
- Li, J., Park, J., Foss, D., Goldschneider, I. 2009. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J Exp Med* 206, 607.
- Licona, P., Chimal-Monroy, J., Soldevila, G. 2006. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Dev Dyn* 235, 1124.
- Licona-Limon, P., Aleman-Muench, G., Chimal-Monroy, J., Macias-Silva, M., Garcia-Zepeda, E.A., Matzuk, M.M., Fortoul, T.I., Soldevila, G. 2009. Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 229.
- Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., Petrie, H.T. 2001. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194, 127.
- Lintern-Moore, S., Pantelouris, E.M. 1976. Ovarian development in athymic nude mice. IV. The effect of PMSG and oestradiol on the growth of the oocyte and follicle. *Mech Ageing Dev* 5, 155.
- Lio, C.W., Hsieh, C.S. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28, 100.
- Liu, H.Y., Buenafe, A.C., Matejuk, A., Ito, A., Zamora, A., Dwyer, J., Vandenberg, A.A., Offner, H. 2002. Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function. *J Neurosci Res* 70, 238.
- Liu, X., Bosselut, R. 2004. Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo. *Nat Immunol* 5, 280.
- Liu, Y.J. 2006. A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends Immunol* 27, 215.
- Livak, F., Tourigny, M., Schatz, D.G., Petrie, H.T. 1999. Characterization of TCR Gene Rearrangements During Adult Murine T Cell Development. *J. Immunol.* 162, 2575.
- Lobl, R.T. 1975. Androgenization: alterations in the mechanism of oestrogen action. *J Endocrinol* 66, 79.

- Lu, J.K.H. 1983. Changes in ovarian function and gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats, Plenum Press, New York, 103 pp.
- Lucas, B., Germain, R.N. 1996. Unexpectedly complex regulation of CD4/CD8 coreceptor expression supports a revised model for CD4+CD8+ thymocyte differentiation. *Immunity* 5, 461.
- Luque, J.M., de Blas, M.R., Segovia, S., Guillamon, A. 1992. Sexual dimorphism of the dopamine-beta-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat locus ceruleus. *Brain Res Dev Brain Res* 67, 211.
- Luster, M.I., Hayes, H.T., Korach, K., Tucker, A.N., Dean, J.H., Greenlee, W.F., Boorman, G.A. 1984. Estrogen immunosuppression is regulated through estrogenic responses in the thymus. *J Immunol* 133, 110.
- Lynch, H.E., Goldberg, G.L., Chidgey, A., Van den Brink, M.R., Boyd, R., Sempowski, G.D. 2009. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* 30, 366.
- Madden, K.S., Bellinger, D.L., Felten, S.Y., Snyder, E., Maida, M.E., Felten, D.L. 1997. Alterations in sympathetic innervation of thymus and spleen in aged mice. *Mech Ageing Dev* 94, 165.
- Madden, K.S., Felten, D.L. 2001. Beta-adrenoceptor blockade alters thymocyte differentiation in aged mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47, 189.
- Maffucci, J.A., Gore, A.C. 2006. Age-related changes in hormones and their receptors. in: Conn P.M., ed. *Handbook of models for human aging*. Burlington, San Diego, London Elsevier Academic Press.
- Maggi, E., Cosmi, L., Liotta, F., Romagnani, P., Romagnani, S., Annunziato, F. 2005. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 4, 579.
- Maharjan, S., Serova, L., Sabban, E.L. 2005. Transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase by estrogen: opposite effects with estrogen receptors alpha and beta and interactions with cyclic AMP. *J Neurochem* 93, 1502.
- Maier, C.C., Marchetti, B., LeBoeuf, R.D., Blalock, J.E. 1992. Thymocytes express a mRNA that is identical to hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone mRNA. *Cell Mol Neurobiol* 12, 447.
- Mainiero, F., Colombara, M., Antonini, V., Strippoli, R., Merola, M., Poffe, O., Tridente, G., Ramarli, D. 2003. p38 MAPK is a critical regulator of the

- constitutive and the beta4 integrin-regulated expression of IL-6 in human normal thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* 33, 3038.
- Makino, Y., Yamagata, N., Sasho, T., Adachi, Y., Kanno, R., Koseki, H., Kanno, M., Taniguchi, M. 1993. Extrathymic development of V alpha 14-positive T cells. *J Exp Med* 177, 1399.
- Manavathi, B., Kumar, R. 2006. Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin. *J Cell Physiol* 207, 594.
- Manley, N.R., Richie, E.R., Blackburn, C.C., Condie, B.G., Sage, J. 2012. Structure and function of the thymic microenvironment. *Front Biosci* 17, 2461.
- Marchetti, B., Gallo, F., Farinella, Z., Romeo, C., Morale, M.C. 1996. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors in the neuroendocrine-immune network. Biochemical bases and implications for reproductive physiopathology. *Ann N Y Acad Sci* 784, 209.
- Marchetti, B., Gallo, F., Farinella, Z., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M.C. 2000. Gender, neuroendocrine-immune interactions and neuron-glia plasticity. Role of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH). *Ann N Y Acad Sci* 917, 678.
- Marchetti, B., Guarcello, V., Morale, M.C., Bartoloni, G., Farinella, Z., Cordaro, S., Scapagnini, U. 1989. Luteinizing hormone-releasing hormone-binding sites in the rat thymus: characteristics and biological function. *Endocrinology* 125, 1025.
- Marchetti, B., Morale, M.C., Gallo, F., Batticane, N., Farinella, Z., Cioni, M. 1995. Neuroendocrineimmunology (NEI) at the turn of the century: towards a molecular understanding of basic mechanisms and implications for reproductive physiopathology. *Endocrine* 3, 845.
- Marchetti, B., Morale, M.C., Paradis, P., Bouvier, M. 1994. Characterization, expression, and hormonal control of a thymic beta 2-adrenergic receptor. *Am J Physiol* 267, E718.
- Marchetti, B., Morale, M.C., Pelletier, G. 1990. Sympathetic nervous system control of thymus gland maturation: autoradiographic characterization and localization of the beta2-adrenergic receptors in the rat thymus gland and presence of a sexual dimorphism during ontogenic development. *Progr Neuroendocrinoimmunol*, 103.



- Martin, J.T. 2000. Sexual dimorphism in immune function: the role of prenatal exposure to androgens and estrogens. *Eur J Pharmacol* 405, 251.
- Matechak, E.O., Killeen, N., Hedrick, S.M., Fowlkes, B.J. 1996. MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. *Immunity* 4, 337.
- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., Cyster, J.G. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355.
- Matsuura, A., Kinebuchi, M., Chen, H.Z., Katabami, S., Shimizu, T., Hashimoto, Y., Kikuchi, K., Sato, N. 2000. NKT cells in the rat: organ-specific distribution of NK T cells expressing distinct V alpha 14 chains. *J Immunol* 164, 3140.
- Mayerova, D., Hogquist, K.A. 2004. Central tolerance to self-antigen expressed by cortical epithelial cells. *J Immunol* 172, 851.
- Mayr, S., Walz, C.R., Angele, P., Hernandez-Richter, T., Chaudry, I.H., Loehe, F., Jauch, K.W., Angele, M.K. 2006. Castration prevents suppression of MHC class II (Ia) expression on macrophages after trauma-hemorrhage. *J Appl Physiol* 101, 448.
- Mazzucchelli, R.I., Warming, S., Lawrence, S.M., Ishii, M., Abshari, M., Washington, A.V., Feigenbaum, L., Warner, A.C., Sims, D.J., Li, W.Q., Hixon, J.A., Gray, D.H., Rich, B.E., Morrow, M., Anver, M.R., Cherry, J., Naf, D., Sternberg, L.R., McVicar, D.W., Farr, A.G., Germain, R.N., Rogers, K., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Durum, S.K. 2009. Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice. *PLoS One* 4, e7637.
- McCarthy, M.M., Amateau, S.K., Mong, J.A. 2002. Steroid modulation of astrocytes in the neonatal brain: implications for adult reproductive function. *Biol Reprod* 67, 691.
- McCaughy, T.M., Wilken, M.S., Hogquist, K.A. 2007. Thymic emigration revisited. *J Exp Med* 204, 2513.
- McCrudden, A.B., Stimson, W.H. 1981. Androgen binding cytosol receptors in the rat thymus: physicochemical properties, specificity and localisation. *Thymus* 3, 105.
- McDonnell, D.P. 2004. The molecular determinants of estrogen receptor pharmacology.

- Maturitas 48 Suppl 1, S7.
- McGargill, M.A., Derbinski, J.M., Hogquist, K.A. 2000. Receptor editing in developing T cells. *Nat Immunol* 1, 336.
- Medina, K.L., Garrett, K.P., Thompson, L.F., Rossi, M.I., Payne, K.J., Kincade, P.W. 2001. Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nat Immunol* 2, 718.
- Mehr, R., Perelson, A.S., Fridkis-Hareli, M., Globerson, A. 1996. Feedback regulation of T cell development: manifestations in aging. *Mech Ageing Dev* 91, 195.
- Mehr, R., Perelson, A.S., Fridkis-Hareli, M., Globerson, A. 1997. Regulatory feedback pathways in the thymus. *Immunol Today* 18, 581.
- Meilin, A., Sharabi, Y., Shoham, J. 1997. Analysis of thymic stromal cell subpopulations grown in vitro on extracellular matrix in defined medium--V. Proliferation regulating activities in supernatants of human thymic epithelial cell cultures. *Int J Immunopharmacol* 19, 39.
- Meilin, A., Shoham, J., Schreiber, L., Sharabi, Y. 1995. The role of thymocytes in regulating thymic epithelial cell growth and function. *Scand J Immunol* 42, 185.
- Mertens, B., Verhoeven, G. 1985. Influence of neonatal androgenization on the expression of alpha 2u-globulin in rat liver and submaxillary gland. *J Steroid Biochem* 23, 557.
- Metcalf, D., Moulds, R., Pike, B. 1967. Influence of the spleen and thymus on immune responses in ageing mice. *Clin Exp Immunol* 2, 109.
- Michie, A.M., Zuniga-Pflucker, J.C. 2002. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin Immunol* 14, 311.
- Mićić, M., Lepasavić, G., Ugrešić, N. 1994. Relationships between monoaminergic and cholinergic innervation of the rat thymus during aging. *J Neuroimmunol* 49, 205.
- Milićević, N.M., Milićević, Z., Mujović, S. 1986. Histochemical characterization of the lipid content in the macrophages of the cortico-medullary zone of the rat thymus. *Anat Histol Embryol* 15, 355.
- Min, D., Taylor, P.A., Panoskaltis-Mortari, A., Chung, B., Danilenko, D.M., Farrell, C., Lacey, D.L., Blazar, B.R., Weinberg, K.I. 2002. Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve

- thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* 99, 4592.
- Min, H., Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K. 2004. Reduction in the developmental potential of intrathymic T cell progenitors with age. *J Immunol* 173, 245.
- Min, H., Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K. 2005. Effects of aging on early B- and T-cell development. *Immunol Rev* 205, 7.
- Min, H., Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K. 2006. Reassessing the role of growth hormone and sex steroids in thymic involution. *Clin Immunol* 118, 117.
- Minter, L.M., Osborne, B.A. 2003. Cell death in the thymus-it' s all a matter of contacts. *Semin Immunol* 15, 135.
- Mo, R., Chen, J., Grolleau-Julius, A., Murphy, H.S., Richardson, B.C., Yung, R.L. 2005. Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes. *J Immunol*. 174:6023-6029.
- Mocchegiani, E., Santarelli, L., Costarelli, L., Cipriano, C., Muti, E., Giacconi, R., Malavolta, M. 2006. Plasticity of neuroendocrine-thymus interactions during ontogeny and ageing: role of zinc and arginine. *Ageing Res Rev*. 5:281-309.
- Moore, A., Donahue, C.J., Bauer, K.D., Mather, J.P. 1998. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methods Cell Biol* 57, 265.
- Mor, G., Munoz, A., Redlinger, R., Jr., Silva, I., Song, J., Lim, C., Kohen, F. 2001. The role of the Fas/Fas ligand system in estrogen-induced thymic alteration. *Am J Reprod Immunol* 46, 298.
- Morale, M.C., Batticane, N., Bartoloni, G., Guarcello, V., Farinella, Z., Galasso, M.G., Marchetti, B. 1991. Blockade of central and peripheral luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors in neonatal rats with a potent LHRH-antagonist inhibits the morphofunctional development of the thymus and maturation of the cell-mediated and humoral immune responses. *Endocrinology* 128, 1073.
- Muller, S., Weihe, E. 1991. Interrelation of peptidergic innervation with mast cells and ED1-positive cells in rat thymus. *Brain Behav Immun* 5, 55.
- Muller, S.M., Terszowski, G., Blum, C., Haller, C., Anquez, V., Kuschert, S., Carmeliet, P., Augustin, H.G., Rodewald, H.R. 2005. Gene targeting of VEGF-

- A in thymus epithelium disrupts thymus blood vessel architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10587.
- Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., Tanaka, K. 2007. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316, 1349.
- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., Rudensky, A.Y. 1998. Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280, 450.
- Nancy, P., Berrih-Aknin, S. 2005. Differential estrogen receptor expression in autoimmune myasthenia gravis. *Endocrinology* 146, 2345.
- Narita, J., Miyaji, C., Watanabe, H., Honda, S., Koya, T., Umezumi, H., Ushiki, T., Sugahara, S., Kawamura, T., Arakawa, M., Abo, T. 1998. Differentiation of forbidden T cell clones and granulocytes in the parenchymal space of the liver in mice treated with estrogen. *Cell Immunol* 185, 1.
- Nass, T.E., LaPolta, P.S., Judd, H.L., Lu, J.K. 1984. Alterations in ovarian steroid and gonadotrophin secretion preceding the cessation of regular oestrous cycles in ageing female rats. *J Endocrinol* 100, 43.
- Nawijn, M.C., Ferreira, R., Dingjan, G.M., Kahre, O., Drabek, D., Karis, A., Grosveld, F., Hendriks, R.W. 2001. Enforced expression of GATA-3 during T cell development inhibits maturation of CD8 single-positive cells and induces thymic lymphoma in transgenic mice. *J Immunol* 167, 715.
- Nedjic, J., Aichinger, M., Mizushima, N., Klein, L. 2009. Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr Opin Immunol* 21, 92.
- Nešić, D., Vukmanović, S. 1998. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants. *J Immunol* 160, 3705.
- Ohta, Y. 1995. Sterility in neonatally androgenized female rats and the decidual cell reaction. *Int Rev Cytol* 160, 1.
- Okasha, S.A., Ryu, S., Do, Y., McKallip, R.J., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S. 2001. Evidence for estradiol-induced apoptosis and dysregulated T cell maturation in the thymus. *Toxicology* 163, 49.
- Okuyama, R., Abo, T., Seki, S., Ohteki, T., Sugiura, K., Kusumi, A., Kumagai, K. 1992.

- Estrogen administration activates extrathymic T cell differentiation in the liver. *J Exp Med* 175, 661.
- Oner, H., Ozan, E. 2002. Effects of gonadal hormones on thymus gland after bilateral ovariectomy and orchidectomy in rats. *Arch Androl* 48, 115.
- Ortman, C.L., Dittmar, K.A., Witte, P.L., Le, P.T. 2002. Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int Immunol* 14, 813.
- Pearse, G. 2006. Histopathology of the thymus. *Toxicol Pathol* 34, 515.
- Pejčić-Karapetrović, B., Kosec, D., Leposavić, G. 2001. Differential effects of male and female gonadal hormones on the intrathymic T cell maturation. *Dev Immunol* 8, 305.
- Penit, C., Vasseur, F. 1997. Expansion of mature thymocyte subsets before emigration to the periphery. *J Immunol* 159, 4848.
- Perišić, M., Arsenović-Ranin, N., Pilipović, I., Kosec, D., Pešić, V., Radojević, K., Leposavić, G. 2010. Role of ovarian hormones in age-associated thymic involution revisited. *Immunobiology* 215, 275.
- Perišić, M., Stojić-Vukanić, Z., Pilipović, I., Kosec, D., Nacka-Aleksić, M., Dikić, J., Arsenovic-Ranin, N., Leposavić, G. 2012. Role of ovarian hormones in T-cell homeostasis: From the thymus to the periphery. *Immunobiology*; [Epub ahead of print]
- Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., Meyer, J.D., Davison, B.L. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180, 1955.
- Pešić, V., Plecaš-Solarović, B., Radojević, K., Kosec, D., Pilipović, I., Perišić, M., Leposavić, G. 2007. Long-term beta-adrenergic receptor blockade increases levels of the most mature thymocyte subsets in aged rats. *Int Immunopharmacol.* 7:674-686.
- Pešić, V., Kosec, D., Radojević, K., Pilipović, I., Perišić, M., Vidić-Danković, B., Leposavić, G. 2009. Expression of alpha1-adrenoceptors on thymic cells and their role in fine tuning of thymopoiesis. *J Neuroimmunol* 214, 55.
- Petrie, H.T., Zuniga-Pflucker, J.C. 2007. Zoned out: functional mapping of stromal

- signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* 25, 649.
- Phuc, L.H., Papiernik, M., Berrih, S., Duval, D. 1981a. Thymic involution in pregnant mice. I. Characterization of the remaining thymocyte subpopulations. *Clin Exp Immunol* 44, 247.
- Phuc, L.H., Papiernik, M., Dardenne, M. 1981b. Thymic involution in pregnant mice. II. Functional aspects of the remaining thymocytes. *Clin Exp Immunol* 44, 253.
- Pierpaoli, W., Besedovsky, H.O. 1975. Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. *Clin Exp Immunol* 20, 323.
- Pilipović, I., Vidić-Danković, B., Perišić, M., Radojević, K., Čolić, M., Todorović, V., Leposavić, G. 2008. Sexual dimorphism in the catecholamine-containing thymus microenvironment: A role for gonadal hormones. *J Neuroimmunol*.
- Pinos, H., Collado, P., Rodriguez-Zafra, M., Rodriguez, C., Segovia, S., Guillamon, A. 2001. The development of sex differences in the locus coeruleus of the rat. *Brain Res Bull* 56, 73.
- Plotkin, J., Prockop, S.E., Lepique, A., Petrie, H.T. 2003. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 171, 4521.
- Plut, C., Ribiere, C., Giudicelli, Y., Dausse, J.P. 2002. Gender differences in hypothalamic tyrosine hydroxylase and alpha(2)-adrenoceptor subtype gene expression in cafeteria diet-induced hypertension and consequences of neonatal androgenization. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 525.
- Polanczyk, M.J., Carson, B.D., Subramanian, S., Afentoulis, M., Vandenbark, A.A., Ziegler, S.F., Offner, H. 2004. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol* 173, 2227.
- Polanczyk, M.J., Hopke, C., Huan, J., Vandenbark, A.A., Offner, H. 2005. Enhanced FoxP3 expression and Treg cell function in pregnant and estrogen-treated mice. *J Neuroimmunol* 170, 85.
- Porritt, H.E., Gordon, K., Petrie, H.T. 2003. Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med* 198, 957.
- Prockop, S.E., Palencia, S., Ryan, C.M., Gordon, K., Gray, D., Petrie, H.T. 2002. Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors

- through the thymic cortex. *J Immunol* 169, 4354.
- Proietto, A.I., Lahoud, M.H., Wu, L. 2008. Distinct functional capacities of mouse thymic and splenic dendritic cell populations. *Immunol Cell Biol* 86, 700.
- Qayyum, M.A., Fatani, J.A. 1985. Use of glyoxylic acid in the demonstration of autonomic nerve profiles. *Experientia* 41, 1389.
- Qiu, Q., Ravens, I., Seth, S., Rathinasamy, A., Maier, M.K., Davalos-Miszlitz, A., Forster, R., Bernhardt, G. 2010. CD155 is involved in negative selection and is required to retain terminally maturing CD8 T cells in thymus. *J Immunol* 184, 1681.
- Radojević, K., Kosec, D., Perišić, M., Pilipović, I., Vidić-Danković, B., Lepsavić, G. 2011. Neonatal androgenization affects the efficiency of beta-adrenoceptor-mediated modulation of thymopoiesis. *J Neuroimmunol* 239, 68.
- Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J., MacDonald, H.R. 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5, 247.
- Rao, L.V., Cleveland, R.P., Ataya, K.M. 1993. Alterations in thymic and bone marrow lymphocyte subpopulations in GnRH agonist treated prepubertal female mice. *J Reprod Immunol* 25, 167.
- Rauški, A., Kosec, D., Vidić-Danković, B., Radojević, K., Plećaš-Solarović, B., Lepsavić, G. 2003. Thymopoiesis following chronic blockade of beta-adrenoceptors. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 25, 513.
- Raveche, E.S., Vigersky, R.A., Rice, M.K., Steinberg, A.D. 1980. Murine thymic androgen receptors. *J Immunopharmacol* 2, 425.
- Rezzani, R., Bonomini, F., Rodella, L.F. 2008. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Prog Histochem Cytochem* 43, 73.
- Rijhsinghani, A.G., Thompson, K., Bhatia, S.K., Waldschmidt, T.J. 1996. Estrogen blocks early T cell development in the thymus. *Am J Reprod Immunol* 36, 269.
- Roberts, J.M., Insel, P.A., Goldfien, A. 1981. Regulation of myometrial adrenoreceptors and adrenergic response by sex steroids. *Mol Pharmacol* 20, 52.
- Roberts, J.M., Riemer, R.K., Bottari, S.P., Wu, Y.Y., Goldfien, A. 1989. Hormonal regulation myometrial adrenergic responses: the receptor and beyond. *J Dev Physiol* 11, 125.
- Rodewald, H.R. 2008. Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol* 26, 355.

- Romanyukha, A.A., Yashin, A.I. 2003. Age related changes in population of peripheral T cells: towards a model of immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 124, 433.
- Rosendahl, A., Speletas, M., Leandersson, K., Ivars, F., Sideras, P. 2003. Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoeisis. *Int Immunol* 15, 1401.
- Rossi, S.W., Jenkinson, W.E., Anderson, G., Jenkinson, E.J. 2006. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* 441, 988.
- Rossi, S.W., Kim, M.Y., Leibbrandt, A., Parnell, S.M., Jenkinson, W.E., Glanville, S.H., McConnell, F.M., Scott, H.S., Penninger, J.M., Jenkinson, E.J., Lane, P.J., Anderson, G. 2007. RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J Exp Med* 204, 1267.
- Ruitenbergh, E.J., Berkvens, J.M. 1977. The morphology of the endocrine system in congenitally athymic (nude) mice. *J Pathol* 121, 225.
- Ryan, M.R., Shepherd, R., Leavey, J.K., Gao, Y., Grassi, F., Schnell, F.J., Qian, W.P., Kersh, G.J., Weitzmann, M.N., Pacifici, R. 2005. An IL-7-dependent rebound in thymic T cell output contributes to the bone loss induced by estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16735.
- Sakabe, K., Kawashima, I., Urano, R., Seiki, K., Itoh, T. 1994. Effects of sex steroids on the proliferation of thymic epithelial cells in a culture model: a role of protein kinase C. *Immunol Cell Biol* 72, 193.
- Sakabe, K., Okuma, M., Karaki, S., Matsuura, S., Yoshida, T., Aikawa, H., Izumi, S., Kayama, F. 1999. Inhibitory effect of natural and environmental estrogens on thymic hormone production in thymus epithelial cell culture. *Int J Immunopharmacol* 21, 861.
- Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22, 531.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various



- autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775.
- Saran, N., Lyszkiewicz, M., Pommerencke, J., Witzlau, K., Vakilzadeh, R., Ballmaier, M., von Boehmer, H., Krueger, A. 2010. Multiple extrathymic precursors contribute to T-cell development with different kinetics. *Blood* 115, 1137.
- Sato, K., Ohtsuka, K., Hasegawa, K., Yamagiwa, S., Watanabe, H., Asakura, H., Abo, T. 1995. Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. *J Exp Med* 182, 759.
- Savino, W., Bartoccioni, E., Homo-Delarche, F., Gagnerault, M.C., Itoh, T., Dardenne, M. 1988. Thymic hormone containing cells--IX. Steroids in vitro modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells. *J Steroid Biochem* 30, 479.
- Savino, W., Dardenne, M. 2000. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev* 21, 412.
- Savino, W., Mendes-Da-Cruz, D.A., Smaniotto, S., Silva-Monteiro, E., Villa-Verde, D.M. 2004. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol* 75, 951.
- Savino, W., Postel-Vinay, M.C., Smaniotto, S., Dardenne, M. 2002. The thymus gland: a target organ for growth hormone. *Scand J Immunol* 55, 442.
- Schmidt, B.M., Gerdes, D., Feuring, M., Falkenstein, E., Christ, M., Wehling, M. 2000. Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol* 21, 57.
- Schnell, S., Demolliere, C., van den Berk, P., Kirberg, J., Jacobs, H. 2006. Constitutive expression of the pre-TCR enables development of mature T cells. *Int Immunol* 18, 911.
- Schuurs, A.H., Verheul, H.A. 1990. Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J Steroid Biochem* 35, 157.
- Screpanti, I., Meco, D., Morrone, S., Gulino, A., Mathieson, B.J., Frati, L. 1991. In vivo modulation of the distribution of thymocyte subsets: effects of estrogen on the expression of different T cell receptor V beta gene families in CD4-, CD8-thymocytes. *Cell Immunol* 134, 414.

- Screpanti, I., Morrone, S., Meco, D., Santoni, A., Gulino, A., Paolini, R., Crisanti, A., Mathieson, B.J., Frati, L. 1989. Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J Immunol* 142, 3378.
- Screpanti, I., Scarpa, S., Meco, D., Bellavia, D., Stuppia, L., Frati, L., Modesti, A., Gulino, A. 1995. Epidermal growth factor promotes a neural phenotype in thymic epithelial cells and enhances neuropoietic cytokine expression. *J Cell Biol* 130, 183.
- Seddon, B., Mason, D. 2000. The third function of the thymus. *Immunol Today* 21, 95.
- Segovia, S., Guillamon, A., del Cerro, M.C., Ortega, E., Perez-Laso, C., Rodriguez-Zafra, M., Beyer, C. 1999. The development of brain sex differences: a multisignaling process. *Behav Brain Res* 105, 69.
- Seiki, K., Sakabe, K., Fujii-Hanamoto, H., Kawashima, I., Akatsuka, A., Ogawa, H. 1988. Localization of sex steroid receptor cells in thymus, with special reference to thymic factor-producing cells. *Med Sci Res* 16, 967.
- Selvaraj, V., Bunick, D., Finnigan-Bunick, C., Johnson, R.W., Wang, H., Liu, L., Cooke, P.S. 2005. Gene expression profiling of 17beta-estradiol and genistein effects on mouse thymus. *Toxicol Sci* 87, 97.
- Sempowski, G.D., Hale, L.P., Sundy, J.S., Massey, J.M., Koup, R.A., Douek, D.C., Patel, D.D., Haynes, B.F. 2000. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J Immunol* 164, 2180.
- Sempowski, G.D., Rhein, M.E., Searce, R.M., Haynes, B.F. 2002. Leukemia inhibitory factor is a mediator of *Escherichia coli* lipopolysaccharide-induced acute thymic atrophy. *Eur J Immunol* 32, 3066.
- Serova, L., Rivkin, M., Nakashima, A., Sabban, E.L. 2002. Estradiol stimulates gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat locus coeruleus. *Neuroendocrinology* 75, 193.
- Serwold, T., Ehrlich, L.I., Weissman, I.L. 2009. Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. *Blood* 113, 807.

- Shackelford, D.A., Smith, A.V., Trowbridge, I.S. 1987. Changes in gene expression induced by a phorbol diester: expression of IL 2 receptor, T3, and T cell antigen receptor. *J Immunol* 138, 613.
- Shames, R.S. 2002. Gender differences in the development and function of the immune system. *J Adolesc Health* 30, 59.
- Shanker, A. 2004. Is thymus redundant after adulthood? *Immunol Lett* 91, 79.
- Shevach, E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389.
- Shevach, E.M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30, 636.
- Shortman, K., Vremec, D., Corcoran, L.M., Georgopoulos, K., Lucas, K., Wu, L. 1998. The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunol Rev* 165, 39.
- Shortman, K., Vremec, D., Egerton, M. 1991. The kinetics of T cell antigen receptor expression by subgroups of CD4+8+ thymocytes: delineation of CD4+8+3(2+) thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells. *J Exp Med* 173, 323.
- Simerly, R.B., Young, B.J., Capozza, M.A., Swanson, L.W. 1989. Estrogen differentially regulates neuropeptide gene expression in a sexually dimorphic olfactory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4766.
- Sitnicka, E. 2009. From the bone marrow to the thymus: the road map of early stages of T-cell development. *Crit Rev Immunol* 29, 487.
- Sminia, T., van Asselt, A.A., van de Ende, M.B., Dijkstra, C.D. 1986. Rat thymus macrophages: an immunohistochemical study on fetal, neonatal and adult thymus. *Thymus* 8, 141.
- Sprent, J., Webb, S.R. 1995. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr Opin Immunol* 7, 196.
- Staal, F.J., Meeldijk, J., Moerer, P., Jay, P., van de Weerd, B.C., Vainio, S., Nolan, G.P., Clevers, H. 2001. Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur J Immunol* 31, 285.
- Staal, F.J., Weerkamp, F., Baert, M.R., van den Burg, C.M., van Noort, M., de Haas, E.F., van Dongen, J.J. 2004. Wnt target genes identified by DNA microarrays in

- immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J Immunol* 172, 1099.
- Staples, J.E., Gasiewicz, T.A., Fiore, N.C., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Silverstone, A.E. 1999. Estrogen receptor alpha is necessary in thymic development and estradiol-induced thymic alterations. *J Immunol* 163, 4168.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., Hogquist, K.A. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139.
- Surh, C.D., Sprent, J. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100.
- Surh, C.D., Sprent, J. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29, 848.
- Sutherland, J.S., Goldberg, G.L., Hammett, M.V., Uldrich, A.P., Berzins, S.P., Heng, T.S., Blazar, B.R., Millar, J.L., Malin, M.A., Chidgey, A.P., Boyd, R.L. 2005. Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade. *J Immunol* 175, 2741.
- Suzuki, M., Yoshida, S., Nishihara, M., Takahashi, M. 1998. Identification of a sex steroid-inducible gene in the neonatal rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 242, 127.
- Sykes, M. 1990. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. *J Immunol* 145, 3209.
- Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6, 127.
- Takai, Y., Wong, G.G., Clark, S.C., Burakoff, S.J., Herrmann, S.H. 1988. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 140, 508.
- Takeda, S., Rodewald, H.R., Arakawa, H., Bluethmann, H., Shimizu, T. 1996. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5, 217.
- Tan, C., Taylor, A.A., Coburn, M.Z., Marino, J.H., Van De Wiele, C.J., Teague, T.K. 2011. Ten-color flow cytometry reveals distinct patterns of expression of CD124 and CD126 by developing thymocytes. *BMC Immunol* 12, 36.
- Taniguchi, M., Seino, K., Nakayama, T. 2003. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 4, 1164.

- Taub, D.D., Longo, D.L. 2005. Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev* 205, 72.
- Teh, H.S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Bluthmann, H., von Boehmer, H. 1988. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335, 229.
- Thangavel, C., Dhir, R.N., Volgin, D.V., Shapiro, B.H. 2007. Sex-dependent expression of CYP2C11 in spleen, thymus and bone marrow regulated by growth hormone. *Biochem Pharmacol* 74, 1476.
- Thoman, M.L. 1995. The pattern of T lymphocyte differentiation is altered during thymic involution. *Mech Ageing Dev* 82, 155.
- Tibbetts, T.A., DeMayo, F., Rich, S., Conneely, O.M., O'Malley, B.W. 1999. Progesterone receptors in the thymus are required for thymic involution during pregnancy and for normal fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12021.
- Tornwall, J., Carey, A.B., Fox, R.I., Fox, H.S. 1999. Estrogen in autoimmunity: expression of estrogen receptors in thymic and autoimmune T cells. *J Genet Specif Med* 2, 33.
- Tough, D.F., Sprent, J. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* 179, 1127.
- Trotter, R.N., Stornetta, R.L., Guyenet, P.G., Roberts, M.R. 2007. Transneuronal mapping of the CNS network controlling sympathetic outflow to the rat thymus. *Auton Neurosci* 131, 9.
- Tseng, Y.L., Wu, M.H., Yang, H.C., Wang, C.Y., Lin, C.F. 2010. Autocrine IL-6 regulates GRO-alpha production in thymic epithelial cells. *Cytokine* 51, 195.
- Tyznik, A.J., Sun, J.C., Bevan, M.J. 2004. The CD8 population in CD4-deficient mice is heavily contaminated with MHC class II-restricted T cells. *J Exp Med* 199, 559.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R.L., Takahama, Y. 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* 200, 493.
- Uotinen, N., Puustinen, R., Pasanen, S., Manninen, T., Kivineva, M., Syvala, H., Tuohimaa, P., Ylikomi, T. 1999. Distribution of progesterone receptor in female

- mouse tissues. *Gen Comp Endocrinol* 115, 429.
- Utsuyama, M., Hirokawa, K. 1989. Hypertrophy of the thymus and restoration of immune functions in mice and rats by gonadectomy. *Mech Ageing Dev* 47, 175.
- van de Wijngaert, F.P., Kendall, M.D., Schuurman, H.J., Rademakers, L.H., Kater, L. 1984. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 237, 227.
- van Ewijk, W. 1991. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 9, 591.
- van Ewijk, W., Brekelmans, P.J., Jacobs, R., Wisse, E. 1988. Lymphoid microenvironments in the thymus and lymph node. *Scanning Microsc* 2, 2129.
- van Ewijk, W., Hollander, G., Terhorst, C., Wang, B. 2000. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* 127, 1583.
- van Ewijk, W., Shores, E.W., Singer, A. 1994. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today* 15, 214.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39.
- Vicente, A., Varas, A., Moreno, J., Sacedon, R., Jimenez, E., Zapata, A.G. 1995. Ontogeny of rat thymic macrophages. Phenotypic characterization and possible relationships between different cell subsets. *Immunology* 85, 99.
- von Boehmer, H., Kisielow, P. 2006. Negative selection of the T-cell repertoire: where and when does it occur? *Immunol Rev* 209, 284.
- von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E., Murray, R. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181, 1519.
- von Patay, B., Kurz, B., Mentlein, R. 1999. Effect of transmitters and co-transmitters of the sympathetic nervous system on interleukin-6 synthesis in thymic epithelial cells. *Neuroimmunomodulation* 6, 45.
- von Patay, B., Loppnow, H., Feindt, J., Kurz, B., Mentlein, R. 1998. Catecholamines and lipopolysaccharide synergistically induce the release of interleukin-6 from

- thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol* 86, 182.
- Wajeman-Chao, S.A., Lancaster, S.A., Graf, L.H., Jr., Chambers, D.A. 1998. Mechanism of catecholamine-mediated destabilization of messenger RNA encoding Thy-1 protein in T-lineage cells. *J Immunol* 161, 4825.
- Wang, C., Dehghani, B., Magrisso, I.J., Rick, E.A., Bonhomme, E., Cody, D.B., Elenich, L.A., Subramanian, S., Murphy, S.J., Kelly, M.J., Rosenbaum, J.S., Vandenbark, A.A., Offner, H. 2008. GPR30 Contributes to Estrogen-Induced Thymic Atrophy. *Mol Endocrinol* 22, 636.
- Wang, L., Xiong, Y., Bosselut, R. 2010. Tenuous paths in unexplored territory: From T cell receptor signaling to effector gene expression during thymocyte selection. *Semin Immunol* 22, 294.
- Watanobe, H., Habu, S. 2003. Manipulation of neonatal gonadal steroid milieu and leptin secretion in later life in male and female rats. *Regul Pept* 110, 219.
- Weinreich, M.A., Hogquist, K.A. 2008. Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J Immunol* 181, 2265.
- Weisz, J., Lloyd, C.W. 1965. Estrogen and androgen production in vitro from 7-3-H-progesterone by normal and polycystic rat ovaries. *Endocrinology* 77, 735.
- Wernli, G., Hasan, W., Bhattacharjee, A., van Rooijen, N., Smith, P.G. 2009. Macrophage depletion suppresses sympathetic hyperinnervation following myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 104, 681.
- Whalen, R.E., Luttge, W.G. 1971. Perinatal administration of dihydrotestosterone to female rats and the development of reproductive function. *Endocrinology* 89, 1320.
- White, A.J., Withers, D.R., Parnell, S.M., Scott, H.S., Finke, D., Lane, P.J., Jenkinson, E.J., Anderson, G. 2008. Sequential phases in the development of Aire-expressing medullary thymic epithelial cells involve distinct cellular input. *Eur J Immunol* 38, 942.
- Wilkinson, M., Herdon, H.J. 1982. Diethylstilbestrol regulates the number of alpha- and beta-adrenergic binding sites in incubated hypothalamus and amygdala. *Brain Res* 248, 79.
- Willems, L., Li, S., Rutgeerts, O., Lenaerts, C., Waer, M., Billiau, A.D. 2011. IL-7 is required for the development of the intrinsic function of marginal zone B cells

- and the marginal zone microenvironment. *J Immunol* 187, 3587.
- Williams, K.M., Lucas, P.J., Bare, C.V., Wang, J., Chu, Y.W., Tayler, E., Kapoor, V., Gress, R.E. 2008. CCL25 increases thymopoiesis after androgen withdrawal. *Blood* 112, 3255.
- Williams, L.T., Lefkowitz, R.J. 1977. Regulation of rabbit myometrial alpha adrenergic receptors by estrogen and progesterone. *J Clin Invest* 60, 815.
- Williams, O., Tanaka, Y., Tarazona, R., Kioussis, D. 1997. The agonist-antagonist balance in positive selection. *Immunol Today* 18, 121.
- Wilson, C.A., Davies, D.C. 2007. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction* 133, 331.
- Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., Villadangos, J.A. 2003. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 102, 2187.
- Windmill, K.F., Meade, B.J., Lee, V.W. 1993. Effect of prepubertal gonadectomy and sex steroid treatment on the growth and lymphocyte populations of the rat thymus. *Reprod Fertil Dev* 5, 73.
- Wira, C.R., Fahey, J.V., Abrahams, V.M., Rossoll, R.M. 2003. Influence of stage of the reproductive cycle and estradiol on thymus cell antigen presentation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84, 79.
- Wise, P.M. 1982. Alterations in the proestrous pattern of median eminence LHRH, serum LH, FSH, estradiol and progesterone concentrations in middle-aged rats. *Life Sci* 31, 165.
- Witt, C.M., Robey, E.A. 2005. Thymopoiesis in 4 dimensions. *Semin Immunol* 17, 95.
- Wolf, S.S., Cohen, A. 1992. Expression of cytokines and their receptors by human thymocytes and thymic stromal cells. *Immunology* 77, 362.
- Woollett, G.R., Barclay, A.N., Puklavec, M., Williams, A.F. 1985. Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 15:168-173.
- Wu, L., Antica, M., Johnson, G.R., Scollay, R., Shortman, K. 1991. Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* 174, 1617.



- Xi, H., Schwartz, R., Engel, I., Murre, C., Kersh, G.J. 2006. Interplay between ROR $\gamma$ , Egr3, and E proteins controls proliferation in response to pre-TCR signals. *Immunity* 24, 813.
- Xystrakis, E., Cavailles, P., Dejean, A.S., Cautain, B., Colacios, C., Lagrange, D., van de Gaar, M.J., Bernard, I., Gonzalez-Dunia, D., Damoiseaux, J., Fournie, G.J., Saoudi, A. 2004. Functional and genetic analysis of two CD8 T cell subsets defined by the level of CD45RC expression in the rat. *J Immunol* 173, 3140.
- Yang, Q., Jeremiah Bell, J., Bhandoola, A. 2010. T-cell lineage determination. *Immunol Rev* 238, 12.
- Yao, G., Hou, Y. 2004. Thymic atrophy via estrogen-induced apoptosis is related to Fas/FasL pathway. *Int Immunopharmacol* 4, 213.
- Yarilin, A.A., Belyakov, I.M. 2004. Cytokines in the thymus: production and biological effects. *Curr Med Chem* 11, 447.
- Yellayi, S., Naaz, A., Szewczykowski, M.A., Sato, T., Woods, J.A., Chang, J., Segre, M., Allred, C.D., Helferich, W.G., Cooke, P.S. 2002. The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern? *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7616.
- Yellayi, S., Teuscher, C., Woods, J.A., Welsh, T.H., Jr., Tung, K.S., Nakai, M., Rosenfeld, C.S., Lubahn, D.B., Cooke, P.S. 2000. Normal development of thymus in male and female mice requires estrogen/estrogen receptor- $\alpha$  signaling pathway. *Endocrine* 12, 207.
- Yu, Y., Yuan, F., Li, X., Lin, D., Lan, Z., Rao, C.V., Lei, Z. 2010. Luteinizing hormone receptor deficiency increases the susceptibility to alkylating agent-induced lymphomagenesis in mice. *Horm Cancer* 1, 256.
- Yuan, J., Crittenden, R.B., Bender, T.P. 2010. c-Myb promotes the survival of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive thymocytes through upregulation of Bcl-xL. *J Immunol* 184, 2793.
- Zamoyska, R., Lovatt, M. 2004. Signalling in T-lymphocyte development: integration of signalling pathways is the key. *Curr Opin Immunol* 16, 191.
- Zediak, V.P., Maillard, I., Bhandoola, A. 2007. Multiple prethymic defects underlie age-related loss of T progenitor competence. *Blood* 110, 1161.
- Zoller, A.L., Kersh, G.J. 2006. Estrogen induces thymic atrophy by eliminating early

- thymic progenitors and inhibiting proliferation of beta-selected thymocytes. *J Immunol* 176, 7371.
- Zoller, A.L., Schnell, F.J., Kersh, G.J. 2007. Murine pregnancy leads to reduced proliferation of maternal thymocytes and decreased thymic emigration. *Immunology* 121, 207.
- Zubkova, I., Mostowski, H., Zaitseva, M. 2005. Up-regulation of IL-7, stromal-derived factor-1 alpha, thymus-expressed chemokine, and secondary lymphoid tissue chemokine gene expression in the stromal cells in response to thymocyte depletion: implication for thymus reconstitution. *J Immunol* 175, 2321.
- Zuniga-Pflucker, J.C., Lenardo, M.J. 1996. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr Opin Immunol* 8, 215.

## ***Biografija***

Milica Perišić je rođena 9.8.1978. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 2004. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na izornoj oblasti Eksperimentalna biomedicina sa srednjom ocenom 9.93. Poslediplomske studije iz oblasti Imunobiologija upisala je na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu 2004. godine. Doktorske studije u okviru studijskog programa Neuronauke-Neurobiologija sa neuroimunologijom, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisala je 2006. godine.

Zaposlena je na Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak” od 2004. godine, gde kao istraživač-pripravnik, a od 2008. kao istraživač-saradnik učestvuje na projektima : „Uloga hormona, neuropeptida i kateholamina u modulaciji sazrevanja limfocita i funkciji zrelih ćelija imunskog sistema” (1239), „Neuroendokrina modulacija imunskog odgovora: uloga simpato-adrenomedularnog sistema“ (145049) i „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: Imunomodulatorni potencijal estrogena“ (175050), koje finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

Član je Društva imunologa Srbije od 2006. godine.

Milica Perišić je do sada je bila autor i koautor u devetnaest naučnih publikacija međunarodnog značaja (četiri rada u vrhunskim međunarodnim časopisima, šest radova u istaknutim međunarodnim časopisima i devet radova u međunarodnim časopisima), kao i u deset saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i šest saopštenja na skupovima nacionalnog značaja iz uže naučne oblasti.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Милица Перишић

број индекса КА060140

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

УЛОГА ХОРМОНА ЈАЈНИКА У ИНВОЛУЦИЈИ ТИМУСА ПАЦОВА

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

Потпис докторанда

У Београду, 2.7.2012.

  
\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Милица Перишић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ КА060140 \_\_\_\_\_

Студијски програм НЕУРОНАУКЕ (Неуробиологија са неуроимунологијом)

Наслов рада УЛОГА ХОРМОНА ЈАЈНИКА У ИНВОЛУЦИЈИ ТИМУСА ПАЦОВА

Ментор Др сц. Гордана Лепосавић, редовни професор,

Универзитет у Београду-Фармацеутски факултет

Потписани/а \_\_\_\_\_ Милица Перишић \_\_\_\_\_

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, \_\_\_\_\_ 2.7.2012. \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

УЛОГА ХОРМОНА ЈАЈНИКА У ИНВОЛУЦИЈИ ТИМУСА ПАЦОВА

---

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 2.7.2012.



1. Ауторство - Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.