

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivan M. Pilipović

**KATEHOLAMINI KAO MEDIJATORI
DELOVANJA MUŠKIH POLNIH
HORMONA NA TIMOPOEZU**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivan M. Pilipović

**CATECHOLAMINES AS MEDIATORS OF
MALE GONADAL HORMONE ACTION
ON THYMOPOIESIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentori:

Dr Gordana Leposavić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Gordana Cvijić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije:

Dr Gordana Leposavić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Gordana Cvijić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Duško Kosec, naučni savetnik,
Institut za virusologiju, vakcine i serume “Torlak”

Članovi Komisije za odbranu doktorske disertacije:

Dr Gordana Leposavić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Nebojša Jasnić, docent,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Duško Kosec, naučni savetnik,
Institut za Virusologiju, vakcine i serume „Torlak“

Datum odbrane:

Zahvalnost

Ovaj rad je nastao u Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak”, u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“. Ovom prilikom želim da izrazim svoju zahvalnost svima koji su mi pri izradi rada nesebično pomogli.

Najveću zahvalnost izražavam svom mentoru, prof. dr Gordani Leposavić, koja mi je usmeravanjem u oblasti imunologije, svojim saznanjima, sugestijama i predlozima pružila svesrdnu stručnu pomoć i moralnu podršku tokom osam godina rada u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“.

Zahvalio bih se i članovima Komisije, prof. dr Gordani Cvijić, dr Dušku Kosecu i docentu dr Nebojši Jasniću, na korisnim sugestijama, diskusijama i drugoj pomoći u toku izrade ovog rada.

Istraživanja i rezultati ostvareni u ovoj disertaciji su realizovani u okviru projekata „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 je finansijski podržalo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Ovom prilikom želim da se zahvalim i svim kolegama iz Centra koji su mi pomogli u izvođenju eksperimenta, a posebno Kaći i Milici, Slađi i Jasni, kao i kolegama sa Farmaceutskog fakulteta, Neveni, Zorici, Jasmini, Mirjani, Vesni i Bilji.

Na kraju, zahvaljujem se svojim roditeljima, i roditeljima svoje supruge, na neizmernoj pomoći u važnim porodičnim obavezama, supruzi Stani i sinu Nikoli, na razumevanju, strpljenju i odricanju.

Beograd, oktobar 2012.

Ivan Pilipović

KATEHOLAMINI KAO MEDIJATORI DELOVANJA MUŠKIH POLNIH HORMONA NA TIMOPOEZU

Rezime

Danas je široko prihvaćeno mišljenje da je progresivno smanjenje efikasnosti timopoeze, koje počinje u pubertetu, kauzalno povezano sa porastom koncentracije polnih hormona. Pored toga, i koncentracija kateholamina, toničnih inhibitora timopoeze posredstvom β -adrenergičkih receptora, se u timusu povećava, počevši od pubertetnog perioda. Poznato je da zrele ćelije imunskog sistema (T-limfociti, makrofage i dendritske ćelije), i različiti tipovi epitelnih ćelija, imaju sposobnost sinteze kateholamina. Konačno, u različitim tkivima, muški polni hormoni utiču na sintezu kateholamina i ispoljavanje β -adrenergičkih receptora. Ova saznanja su nužno nametnula pitanje da li timociti i/ili ćelije strome timusa poseduju sposobnost sinteze kateholamina, i, ukoliko je odgovor potvrđan, da li i u kojim tipovima ćelija timusa hormoni testisa utiču na sintezu kateholamina i/ili ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora i time, moguće, na modulatorno delovanje kateholamina na proces timopoeze.

Imajući u vidu sve prethodno navedene nalaze, postavljeni su ciljevi ove disertacije: 1) da se utvrdi da li timociti i/ili ćelije strome timusa odraslih mužjaka pacova sintetizuju kateholamine, i da se precizno definišu tipovi ćelija u ovom organu koji ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor, 2) da se ispita da li orhidektomija u uzrastu od 30 dana, kada je timus pacova najosetljiviji na efekte kastracije, utiče na koncentraciju kateholamina i ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu odraslih pacova, i, ako je odgovor potvrđan, 3) da se utvrdi da li se modulatorno delovanje kateholamina na timopoezu razlikuje kod orhidektomisanih i neorhidektomisanih životinja.

Nađeno je da timociti, timusne epitelne ćelije i makrofage sadrže i sintetizuju kateholamine. Osim toga, subpopulacije ovih tipova ćelija, takođe, ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor.

Orhidektomija u uzrastu od 30 dana je smanjila koncentraciju noradrenalina u timusu odraslih životinja, usled smanjenja gustine noradrenergičkih nervnih vlakana i ćelija strome timusa koje sadrže kateholamine i sadržaja noradrenalina u njima. Pored toga, u timusu ovih životinja je detektovano i smanjenje ekspresije iRNK za β_2 -

adrenergički receptor, kao i površinske gustine ovog receptora na membrani timocita. Orhidektomija je dovela do povećanja ukupnog broja timocita, kao i efikasnosti diferencijacije/sazrevanja timocita, a posebno nastanka CD4⁺ T-ćelija, sudeći prema povećanju procentualne zastupljenosti najzrelijih CD4⁺CD8⁻ timocita, sa visokom površinskom gustinom TCR $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$ ++), i svežih timusnih emigranata u okviru populacije CD4⁺ T-ćelija periferne krvi. Opisane promene su, najverovatnije, odražavale intenziviran ulazak prekursora timocita, efikasnije odvijanje njihovog početnog razvoja, efikasniju β -selekciju timocita, kao i smanjenu efikasnost negativne selekcije (najverovatnije usled veće gustine CD90 molekula na membrani timocita). Takođe, u timusu odraslih orhidektomisanih životinja, došlo je i do promena u sazrevanju regulatornih ćelija, sudeći prema smanjenju procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ timocita i povećanju procentualne zastupljenosti CD8⁺CD161⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ ćelija.

Da bi se procenio doprinos mogućih promena u delovanju kateholamina posredstvom β -adrenergičkih receptora povećanoj efikasnosti timopoeze kod orhidektomisanih životinja, ispitivani su efekti četrnaestodnevnog tretmana antagonistom β -adrenergičkih receptora, propranololom, na diferencijaciju/sazrevanje timocita, kod odraslih neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova. Kod odraslih neorhidektomisanih pacova, propranolol je povećao efikasnost diferencijacije/sazrevanja timocita, povećavajući efikasnost ranih faza razvoja CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁻ timocita i, najverovatnije, efikasnost β -selekcije, a smanjujući efikasnost negativne selekcije (najverovatnije usled veće gustine CD90 molekula na membrani timocita). Ovakve promene u timopoezi konačno su dovele do povećanja procentualne zastupljenosti najzrelijih CD4⁺CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ++ i, posebno, CD4⁻CD8⁺TCR $\alpha\beta$ ++ timocita, i odgovarajućeg povećanja procentualne zastupljenosti svežih timusnih emigranata u okviru populacija CD4⁺ i CD8⁺ T-ćelija periferne krvi. Uz sve navedeno, davanje propranolola neorhidektomisanim pacovima je povećalo stvaranje CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ i CD8⁺CD161⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ regulatornih ćelija u timusu, sudeći prema povećanju njihove procentualne zastupljenosti u ovom organu. Prethodno navedeni nalazi su ukazali na postojanje toničnog inhibitorynog delovanja kateholamina, putem β -adrenergičkih receptora, na proces timopoeze. Za razliku od

neorhidektomisanih životinja, tretman propranololom kod odraslih životinja orhidektomisanih 30. dana života, nije se pokazao efikasnim u modulaciji timopoeze.

Imajući u vidu da: 1) u timusu, orhidektomija u uzrastu od 30 dana smanjuje koncentraciju noradrenalina (delujući na sintezu i sadržaj ovog hormona/neurotransmitera u nervnim vlaknima i ćelijama timusa koje sadrže kateholamine), kao i ekspresiju gena za β_2 -adrenergički receptor i time, moguće, efikasnost delovanja kateholamina, i 2) orhidektomija i tretman propranololom kod neorhidektomisanih pacova dovode do sličnih promena, bar u ispoljavanju CD90 molekula na membrani timocita (koje je regulisano delovanjem noradrenalina posredstvom β -adrenergičkih receptora) i posledično u negativnoj selekciji ovih ćelija, može se pretpostaviti da je povećanje efikasnosti timopoeze koje je uočeno kod odraslih pacova koji su orhidektomisani u uzrastu od 30 dana, jednim delom, odražavalo manju efikasnost delovanja kateholamina na timopoezu putem β -adrenergičkih receptora.

Ključne reči: timus; timopoeza; kateholamini; β_2 -adrenergički receptor; hormoni testisa; sveži timusni emigranti; regulatorne T-ćelije.

Naučna oblast: Biologija

Uže naučna oblast: Neuroendokrinoimunologija

UDK broj: [591.463.2+591.483]:591.443(043.3)

CATECHOLAMINES AS MEDIATORS OF MALE GONADAL HORMONE ACTION ON THYMOPOIESIS

Summary

It is widely accepted that the progressive decline in the efficiency of thymopoiesis, starting at puberty, is causally related to increasing concentrations of gonadal hormones. In addition, thymic level of catecholamines, which act, via β -adrenoceptors, as tonic inhibitors of thymopoiesis, increases around puberty. There is a pile of evidence that mature immune cells (T-lymphocytes, macrophages and dendritic cells) as well as different types of epithelial cells, synthesize catecholamines. Furthermore, it has been shown that in various tissues male gonadal hormones affect catecholamine synthesis and β -adrenoceptor expression. These findings imposed the question whether thymocytes and/or thymic stromal cells synthesize catecholamines, and, if so, whether testicular hormones influence the synthesis of catecholamines and/or expression of β_2 -adrenoceptors, and possibly, consequently, the modulatory action of catecholamines on thymopoiesis.

Considering all the aforementioned, the dissertation was aimed to: 1) explore whether thymocytes and/or thymic stromal cells in adult male rats synthesize catecholamines, and to define the types of thymic cells expressing β_2 -adrenoceptor; 2) examine whether orchidectomy at the age of 30 days, when rat thymus is the most sensitive to testicular hormone deprivation, affects catecholamine levels and β_2 -adrenoceptor expression in the thymus of adult rats, and, if so, 3) determine whether the modulatory effects of catecholamines on thymopoiesis differ in orchidectomized and non-orchidectomized animals.

It has been found that thymocytes, thymic epithelial cells and macrophages in adult rats contain and synthesize catecholamines. In addition, it was shown that subsets of these cells also express the β_2 -adrenoceptors.

Orchidectomy at the age of 30 days decreased the concentration of noradrenaline in the thymus of adult animals by diminishing the density of noradrenergic nerve fibers and catecholamine-containing thymic stromal cells and their noradrenaline content. In addition, in thymi of these animals the decreased β_2 -adrenoceptor mRNA expression

and thymocyte β_2 -adrenoceptor surface density were found. Moreover, orchidectomy increased the overall number of thymocytes and efficiency of thymopoiesis, in particular generation of CD4⁺ T cells, judging by the increased proportion of the most mature CD4⁺CD8⁻ thymocytes, expressing TCR $\alpha\beta$ at high level (TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺) and recent thymic emigrants among CD4⁺ T cells in peripheral blood. This most likely reflected enhanced entry of thymocyte precursors, more efficient stages of their initial differentiation, enhanced thymocyte β -selection, and diminished efficiency of negative selection (most likely due to increased CD90 surface density). Moreover, in thymi of adult orchidectomized animals, differentiation/maturation of regulatory cells was also altered, judging by the reduced and increased percentage of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD8⁺CD161⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells, respectively.

Next, to assess the contribution of putative changes in β -adrenoceptor-mediated catecholamine action to the augmented thymopoietic efficiency in orchidectomized rats, the effects of 14-day-long treatment with propranolol, a β -adrenoceptor antagonist, on thymocyte differentiation/maturation in non-orchidectomized and orchidectomized adult rats were examined. Propranolol, in non-orchidectomized adult rats, increased efficiency of thymocyte differentiation/maturation, by enhancing efficiency of the early steps of CD4⁺CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁻ thymocyte development and, most likely, thymocyte β -selection and diminishing efficiency of negative selection (most likely due to increased CD90 surface density). These changes ultimately led to the increased proportion of the most mature CD4⁺CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ and, in particular, CD4⁺CD8⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ thymocytes in thymus, and, consequently, recent thymic emigrants within both CD4⁺ and CD8⁺ peripheral blood T-cell populations. In addition, propranolol treatment in non-orchidectomized rats augmented thymic generation of both CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD8⁺CD161⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ regulatory cells, judging by their increased proportions in the thymus. These findings suggested a tonic β -adrenoceptor-mediated inhibitory action of catecholamines on thymopoiesis. However, differently from non-orchidectomized rats, in orchidectomized rats propranolol treatment was inefficient in modulating thymopoiesis.

Considering that: 1) orchidectomy at the age of 30 days diminished thymic noradrenaline concentration (through affecting its synthesis and content in nerve fibers and catecholamine-containing thymic cells), and thymic β_2 -adrenoceptor gene

expression, and thereby, possibly, efficiency of catecholamine action, and 2) orchidectomy and propranolol treatment, in non-orchidectomized rats, led to similar changes, at least, in thymocyte CD90 expression (that is shown to be regulated by β -adrenoceptor-mediated noradrenaline action) and consequently thymocyte negative selection, it may be assumed that the increase in thymopoietic efficiency in adult rats, orchidectomized at the age of 30 days, partly reflected less efficient β -adrenoceptor-mediated influence of catecholamines on thymopoiesis.

Keywords: thymus; thymopoiesis; catecholamines; β_2 -adrenoceptor, testicular hormones; recent thymic emigrants; regulatory T cells.

General subject area: Biology

Subject area: Neuroendocrinoimmunology

UDC number: [591.463.2+591.483]:591.443(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. SAZREVANJE T-ĆELIJA U TIMUSU	1
1.1.1. Razvoj i struktura timusa	1
1.1.1.1. Ćelije strome timusa	3
1.1.1.1.1. <i>Timusne epitelne ćelije (TEC)</i>	3
1.1.1.1.2. <i>Timusne makrofage (MF)</i>	4
1.1.1.1.3. <i>Timusne dendritske ćelije (DC)</i>	5
1.1.2. Diferencijacija i sazrevanje T-limfocita u timusu	6
1.1.2.1. Rani stadijumi sazrevanja timocita	7
1.1.2.2. Kasni stadijumi sazrevanja timocita	9
1.1.2.2.1. <i>Pozitivna selekcija</i>	10
1.1.2.2.2. <i>Negativna selekcija</i>	11
1.1.2.2.3. <i>Modeli selekcije timocita</i>	12
1.1.2.2.4. <i>Linijsko usmeravanje</i>	13
1.1.2.2.5. <i>Postselekciona proliferacija</i>	14
1.1.2.3. Sazrevanje prirodnih regulatornih CD4+CD25+Foxp3+ T-ćelija	14
1.1.2.4. Sazrevanje regulatornih urođenoubilačkih T-ćelija (NKT ćelija)	16
1.1.2.5. Sveži timusni emigranti	17
1.2. KATEHOLAMINI U TIMUSU	18
1.2.1. Komunikacija između centralnog nervnog i imunskog sistema	18
1.2.2. Noradrenergička inervacija timusa	19
1.2.3. Sinteza kateholamina u ćelijama timusa	21
1.2.4. β-adrenergički receptori u timusu	22
1.2.5. β-adrenergički receptori i timopoeza	24
1.3. UTICAJ MUŠKIH POLNIH HORMONA NA FUNKCIJU TIMUSA	25
1.3.1. Interakcije polnih hormona i imunskog sistema	25
1.3.2. Ekspresija receptora za androgene u ćelijama timusa	26
1.3.3. Uticaj muških polnih hormona na timus	26
1.3.4. Muški polni hormoni i kateholamini	27
1.3.5. Muški polni hormoni i β-adrenergički receptori	29
2. CILJEVI	31

3. MATERIJAL I METODE	32
3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	32
3.2. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL	32
3.3. EKSPERIMENTALNE PROCEDURE	34
3.3.1. Bilateralna orhidektomija	34
3.3.2. Tretman propranololom	34
3.4. HEMIKALIJE, ANTITELA I IMUNOKONJUGATI	35
3.5. IZOLOVANJE ČELIJA TIMUSA I PERIFERNE KRVI	36
3.5.1. Timociti i limfociti periferne krvi	36
3.5.2. Timusne epitelne ćelije	37
3.5.3. Timusne dendritske ćelije	37
3.6. KLONIRANE ČELIJSKE LINIJE	38
3.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KATEHOLAMINA METODOM REVERZNO-FAZNE TEČNE HROMATOGRAFIJE POD VISOKIM PRITISKOM	38
3.7.1. Priprema uzoraka timusnog tkiva i timocita za određivanje koncentracije kateholamina	38
3.7.2. Reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom	39
3.8. DETEKCIJA KATEHOLAMINA I KVANTIFIKACIJA NJIHOVOG SADRŽAJA U NERNVIM VLAKNIMA I ČELIJAMA TIMUSA	39
3.8.1. Kvantifikacija sadržaja kateholamina u nervnim vlaknima i ćelijama timusa merenjem intenziteta fluorescentnog signala	40
3.8.2. Kvantifikacija gustine nervnih vlakana i ćelija timusa koje sadrže kateholamine	41
3.9. IMUNOCITHEMIJSKO BOJENJE	41
3.9.1. Imunocitohemijsko bojenje izolovanih TEC, DC i ćelija epitelnih ćelijskih linija	41
3.9.2. Imunocitohemijsko bojenje preseka timusa	42
3.9.2.1. Jednostruko imunocitohemijsko bojenje	43
3.9.2.2. Dvostruko imunocitohemijsko bojenje	43
3.9.2.3. Kvantifikacija ćelija strome timusa koje sadrže TH i ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor	44

3.10. RELATIVNA KVANTIFIKACIJA EKSPRESIJE GENA METODOM LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE U REALNOM VREMENU	44
3.10.1. Izolacija ukupne RNK iz tkiva timusa i izolovanih timocita	44
3.10.1.1. Tkivo timusa	44
3.10.1.2. Timociti	45
3.10.2. Prevođenje ukupne RNK u komplementarnu DNK	45
3.10.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu	46
3.11. PROTOČNA CITOFUORIMETRIJA	47
3.11.1. Priprema uzoraka za detekciju membranskih antigena	47
3.11.1.1. Izolovanje DN ćelija iz suspenzija timocita tehnikom magnetnog razdvajanja	47
3.11.1.2. Izolovanje T-ćelija iz suspenzija limfocita periferne krvi tehnikom magnetnog razdvajanja	48
3.11.2. Priprema uzoraka za detekciju unutarćelijskih antigena	49
3.11.2.1. TH ili β_2 -adrenergički receptor	49
3.11.2.2. TH i CD3	50
3.11.2.3. Foxp3, CD4 i CD25	50
3.11.3. Protočno citofluorimetrijska analiza	50
3.11.4. Analiza zastupljenosti timocita u apoptozi	51
3.11.5. Analiza zastupljenosti timocita u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa	52
3.12. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	53
4. REZULTATI	54
4.1. SINTEZA KATEHOLAMINA U TIMOCITIMA I ĆELIJAMA STROME TIMUSA ODRASLIH MUŽJAKA PACOVA	54
4.1.1. Timociti odraslih mužjaka pacova sadrže noradrenalin	54
4.1.2. Timociti odraslih mužjaka pacova sintetišu kateholamine	55
4.1.2.1. Analiza ekspresije tirozin hidroksilaze protočnom citofluorimetrijom	55
4.1.2.2. Analiza lokalizacije timocita koji ekspimiraju tirozin hidroksilazu	56

4.1.2.3. Analiza ekspresije gena koji kodiraju enzime uključene u sintezu i degradaciju kateholamina	56
4.1.3. Čelije strome timusa odraslih mužjaka pacova sintetišu kateholamine	57
4.1.3.1. Timusne epitelne ćelije sintetišu kateholamine	57
4.1.3.2. Timusne makrofage sintetišu kateholamine	60
4.1.3.3. Timusne dendritske ćelije ne sintetišu kateholamine	60
4.2. ISPOLJAVANJE β_2-ADRENERGIČKOG RECEPTORA U TIMOCITIMA I ČELIJAMA STROME TIMUSA ODRASLIH MUŽJAKA PACOVA	61
4.2.1. Timociti odraslih mužjaka pacova ispoljavaju β_2-adrenergički receptor	61
4.2.2. Čelije strome timusa odraslih mužjaka pacova ispoljavaju β_2-adrenergički receptor	63
4.2.2.1. Timusne epitelne ćelije ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor	63
4.2.2.2. Timusne makrofage ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor	63
4.3. UTICAJ ORHIDEKTOMIJE U UZRASTU OD 30 DANA NA KONCENTRACIJU KATEHOLAMINA I ISPOLJAVANJE β_2-ADRENERGIČKOG RECEPTORA U TIMUSU ODRASLIH PACOVA	65
4.3.1. Uticaj orhidektomije na koncentraciju noradrenalina u timusu	65
4.3.1.1. Uticaj orhidektomije na gustinu simpatičkih nervnih vlakana u timusu i sadržaj kateholamina u njima	66
4.3.1.2. Uticaj orhidektomije na procentualnu zastupljenost timocita koji sintetišu kateholamine i sadržaj noradrenalina u njima	68
4.3.1.3. Uticaj orhidektomije na gustinu ćelija strome timusa koje sadrže kateholamine i sadržaj kateholamina u njima	68
4.3.2. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje β_2-adrenergičkog receptora u timusu	71
4.3.2.1. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timocitima	71

4.3.2.2. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u ćelijama strome timusa	72
4.4. UTICAJ DUGOTRAJNOG TRETMANA PROPRANOLOLOM NA KONCENTRACIJU KATEHOLAMINA I ISPOLJAVANJE β_2-ADRENERGIČKOG RECEPTORA U TIMUSU U PRISUSTVU I ODSUSTVU HORMONA TESTISA	74
4.4.1. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na koncentraciju noradrenalina u timusu	74
4.4.1.1. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na gustinu simpatičkih nervnih vlakana u timusu i sadržaj kateholamina u njima	76
4.4.1.2. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na procentualnu zastupljenost timocita koji sintetišu kateholamine i sadržaj noradrenalina u njima	76
4.4.1.3. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na gustinu ćelija strome timusa koje sadrže kateholamine i sadržaj kateholamina u njima	80
4.4.2. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na ispoljavanje β_2-adrenergičkog receptora u timusu	82
4.4.2.1. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timocitima	82
4.4.2.2. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u ćelijama strome timusa	84
4.5. UTICAJ ORHIDEKTOMIJE NA DIFERENCIJACIJU/SAZREVANJE TIMOCITA U TIMUSU ODRASLIH PACOVA	86
4.5.1. Uticaj orhidektomije na ukupan broj timocita i masu timusa	86
4.5.2. Uticaj orhidektomije na apoptozu i proliferaciju timocita	86
4.5.2.1. Uticaj orhidektomije na apoptozu timocita	86
4.5.2.2. Uticaj orhidektomije na proliferaciju timocita	88
4.5.3. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje antigena diferencijacije na membrani timocita	88
4.5.3.1 TCR $\alpha\beta$ - timociti	89

4.5.3.1.1. <i>DN TCR$\alpha\beta$- timociti</i>	93
4.5.3.2. TCR $\alpha\beta$ + timociti	93
4.5.3.3. TCR $\alpha\beta$ ++ timociti	95
4.5.4. Uticaj orhidektomije na selekciju timocita	95
4.5.4.1. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje CD69 antigena	95
4.5.4.2. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje CD90 antigena	97
4.5.5. Uticaj orhidektomije na proliferaciju i apoptozu timocita u okviru osnovnih subpopulacija ćelija, koje su razdvojene na osnovu ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora	97
4.5.5.1. Uticaj orhidektomije na apoptozu timocita u okviru osnovnih subpopulacija	97
4.5.5.2. Uticaj orhidektomije na proliferaciju timocita u okviru osnovnih subpopulacija	99
4.5.6. Uticaj orhidektomije na zastupljenost ćelija koje ispoljavaju regulatorni fenotip u timusu	99
4.5.6.1. CD4+CD25+Foxp3+ ćelije	99
4.5.6.2. CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelije	101
4.6. UTICAJ ORHIDEKTOMIJE NA T-ĆELIJSKI ODELJAK PERIFERNE KRVI ODRASLIH PACOVA	103
4.6.1. Populacija T-ćelija	103
4.6.2. CD4+ i CD8+ subpopulacije T-limfocita	104
4.6.3. CD4+ i CD8+ sveži timusni emigranti	105
4.6.4. CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelije	105
4.6.5. CD8+CD161+TCR$\alpha\beta$+ NKT ćelije	107
4.7. UTICAJ DUGOTRAJNOG TRETMANA PROPANOLOLOM NA DIFERENCIJACIJU/SAZREVANJE TIMOCITA U PRISUSTVU I ODSUSTVU HORMONA TESTISA	109
4.7.1. Uticaj tretmana propranololom na ukupan broj timocita i masu timusa	109
4.7.2. Uticaj tretmana propranololom na apoptozu i proliferaciju timocita	109
4.7.2.1. Uticaj tretmana propranololom na apoptozu timocita	110

4.7.2.2. Uticaj tretmana propranololom na proliferaciju timocita	112
4.7.3. Uticaj tretmana propranololom na ispoljavanje antigena diferencijacije na membrani timocita	114
4.7.3.1 TCR $\alpha\beta$ - timociti	114
4.7.3.1.1. DN TCR $\alpha\beta$ - timociti	117
4.7.3.2. TCR $\alpha\beta$ + timociti	118
4.7.3.3. TCR $\alpha\beta$ ++ timociti	119
4.7.4. Uticaj tretmana propranololom na selekciju timocita	120
4.7.4.1. Uticaj tretmana propranololom na ispoljavanje CD69 antigena	120
4.7.4.2. Uticaj tretmana propranololom na ispoljavanje CD90 antigena	120
4.7.5. Uticaj tretmana propranololom na proliferaciju i apoptozu timocita u okviru osnovnih subpopulacija ćelija, koje su razdvojene na osnovu ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora kod orhidektomisanih i neorhidektomisanih pacova	123
4.7.5.1. Uticaj tretmana propranololom na apoptozu timocita u okviru osnovnih subpopulacija	123
4.7.5.2. Uticaj tretmana propranololom na proliferaciju timocita u okviru osnovnih subpopulacija	123
4.7.6. Uticaj tretmana propranololom na zastupljenost ćelija koje ispoljavaju regulatorni fenotip u timusu	124
4.7.6.1. CD4+CD25+Foxp3+ ćelije	124
4.7.6.2. CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelije	124
4.8 UTICAJ DUGOTRAJNOG TRETMANA PROPRANOLOLOM NA T-ĆELIJSKI ODELJAK PERIFERNE KRVI U PRISUSTVU I ODSUSTVU HORMONA TESTISA	127
4.8.1. Populacija T-ćelija	127
4.8.2. CD4+ i CD8+ subpopulacije T-limfocita	127
4.8.3. CD4+ i CD8+ sveži timusni emigranti	129
4.8.4. CD4+CD25+Foxp3+Treg ćelije	131
4.8.5. CD8+CD161+TCR$\alpha\beta$+ NKT ćelije	133
5. DISKUSIJA	135
5.1. Sinteza kateholamina u timocitima i ćelijama strome timusa pacova	135

5.2. Ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timocitima i ćelijama strome timusa pacova	137
5.3. Uticaj orhidektomije na koncentraciju noradrenalina u timusu odraslih pacova	138
5.4. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu odraslih pacova	140
5.5. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na koncentraciju noradrenalina u timusu odraslih pacova u prisustvu i odsustvu hormona testisa	141
5.6. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu odraslih pacova u prisustvu i odsustvu hormona testisa	143
5.7. Uticaj orhidektomije na timopoezu kod odraslih pacova	144
5.7.1. <i>Uticaj orhidektomije na apoptozu i proliferaciju timocita</i>	144
5.7.2. <i>Uticaj orhidektomije na ispoljavanje antigena diferencijacije timocita</i>	146
5.8. Uticaj orhidektomije na broj i fenotipske karakteristike T-ćelija u perifernoj krvi odraslih pacova	151
5.9. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na timopoezu kod odraslih pacova u prisustvu hormona testisa	154
5.9.1. <i>Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na apoptozu i proliferaciju timocita</i>	154
5.9.2. <i>Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na ispoljavanje antigena diferencijacije timocita</i>	155
5.10. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na broj i fenotipske karakteristike T-ćelija u perifernoj krvi odraslih pacova u prisustvu hormona testisa	159
5.11. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na timopoezu i broj i fenotipske karakteristike T-ćelija u perifernoj krvi odraslih pacova u odsustvu hormona testisa	161
6. ZAKLJUČCI	165
7. LITERATURA	168

1. UVOD

1.1. SAZREVANJE T-ĆELIJA U TIMUSU

Imunski sistem predstavlja skup specijalizovanih organa i ćelija, čijom se osnovnom funkcijom smatra uklanjanje stranih antigena iz organizma, poput virusa i bakterija, a u cilju održavanja homeostaze i preživljavanja jedinke (Friedman i Irwin, 1997; Kin i Sanders, 2006). Timus je prvi organ imunskog sistema koji se formira tokom ontogeneze, i smatra se ključnim limfoidnim organom za uspostavljanje funkcionalnog imunskog sistema (Bommhardt i sar., 2004; Pearse, 2006). Naime, odsustvo timusa usled genetskog poremećaja ili timektomije dovodi do drastičnog smanjenja broja perifernih T-limfocita i razvoja ozbiljnih imunodeficijencija (Miller, 2002). Generalno, timus je organ koji obezbeđuje mikrosredinu u kojoj se prekursori poreklom iz kostne srži, kroz niz dobro okarakterisanih stadijuma, razvijaju u različite tipove fenotipski i funkcionalno zrelih T-ćelija, koje naseljavaju periferne limfoidne organe.

1.1.1. Razvoj i struktura timusa

Timus se razvija iz zametka, koji nastaje od endoderma 3. i 4. faringealnog džepa i pripadajuće mezenhimske kapsule koju formiraju ćelije nervne kreste, oko 11. dana embrionalnog razvoja glodara (Blackburn i Manley, 2004; Pearse, 2006). Doprinos ektodermalnih komponenti formiranju timusnog zametka je i dalje predmet debate (Rezzani i sar., 2008). Timusni zametak sačinjava masa epitelnih ćelija, koja privlači prekursore timocita iz krvotoka (Rezzani i sar., 2008), koji migrirajući iz krvnih sudova, kroz mezenhim, počinju naseljavanje timusnog zametka između 11. i 12. dana (Jotereau i sar., 1987). Rana diferencijacija timusnog epitela, koja započinje oko 12. dana, se odvija u odsustvu timocita (Blackburn i Manley, 2004), dok konačno uspostavljanje i održavanje normalne arhitekture timusa zahteva interakciju timusnih epitelnih ćelija (engl. thymic epithelial cells, TEC) sa timocitima, koja započinje posle 15. dana gestacije, a nastavlja se i postnatalno (Blackburn i Manley, 2004; Takahama, 2006). Između 12. i 13. dana embrionalnog razvoja, zametak migrira prema grudnoj duplji, da bi se između 13. i 14. dana timus odvojio od štitaste i paraštitaste žlezde, sa kojima deli

poreklo, i dostigao anatomske pozicije koja približno odgovara onoj kod odraslih jedinki.

Neposredno po rođenju, timus prolazi kroz fazu intenzivnog rasta, u odgovoru na rastuću potrebu organizma za velikim brojem zrelih T-ćelija, da bi, kod glodara, postigao svoju konačnu veličinu do dostizanja polne zrelosti (Pearse, 2006). Počevši od puberteta, masa timusa se progresivno smanjuje, a strukturna organizacija organa se menja, što dovodi do sve manje efikasnosti timopoeze (Bodey i sar., 1997; Taub i Longo, 2005). Ovaj fenomen se opisuje kao „involucija timusa“ (Bodey i sar., 1997; Taub i Longo, 2005) i smatra se osnovnim uzrokom disfunkcije imunskog sistema tokom starenja. Disfunkcija imunskog sistema tokom starenja - imunološko starenje se karakteriše smanjenjem broja naivnih T-limfocita i povećanjem broja T-limfocita memorijskog fenotipa, kao i akumulacijom ćelija regulatornog fenotipa ne periferiji, ali i različitim poremećajima u funkciji zrelih T-ćelija (Taub i Longo, 2005; Haynes i Maue, 2009). Ove promene dovode do povećane podložnosti infektivnim, autoimunskim i malignim bolestima u populaciji starijeg uzrasta (Taub i Longo, 2005).

Timus je limfoepitelni organ koji je, anatomske i morfološke, evolutivno dobro konzerviran (Haley, 2003). Smešten je u perkardijalnom medijastinumu, ventralno od osnove srca. Organ je sačinjen od dva režnja, povezana istmusom od vezivnog tkiva, koji su obavijeni tankom vezivnom kapsulom (Haley, 2003). Kapsula timusa je dvoslojna struktura, sačinjena od kolagena i fibroznih vlakana, pri čemu invaginacije unutrašnjeg sloja formiraju pregrade, koje, delimično, dele režnjeve timusa u režnjiće (Pearse, 2006). Histološki, stroma timusa je organizovana u dva diskretna odeljka, korteks i medulu, razdvojena kortiko-medularnom spojnicom (KMS; engl. cortico-medulary junction). Korteks timusa sadrži gusto raspoređene male timocite kao i velike limfoblaste u supkapsularnom regionu (Pearse, 2006). Medula, sadrži znatno manji broj većih timocita, zrelijih u odnosu na kortikalne (Pearse, 2006). Medularni regioni susednih režnjića pokazuju kontinuitet i mogu zadirati duboko u korteks, čak i do kapsule (Haley, 2003). U KMS se nalaze zreli i nezreli timociti, kao i velik broj krvnih sudova, uglavnom arteriola (Pearse, 2006).

1.1.1.1. Čelije strome timusa

1.1.1.1.1. Timusne epitelne ćelije (TEC)

U odsustvu potpornog vezivnog tkiva, potporu timusu pruža trodimenzionalna mreža epitelno-retikularnih ćelija (Banks, 1993). Istovremeno, TEC predstavljaju i ključnu funkcionalnu komponentu strome timusa, od koje zavise praktično svi koraci u procesu timopoeze (Lee i sar., 2010). Imunocitohemijski, TEC se klasifikuju na supkapsularne, ćelije spoljašnjeg, odnosno dubokog korteksa, i ćelije medule i Hasalova tela. Supkapsularne TEC formiraju sloj dubine od jedne do dve ćelije. U spoljašnjem i dubokom korteksu, kao i uz krvne sudove, TEC su tanke i pljosnate, i pružaju tanke citoplazmatske nastavke velike površine, za interakciju sa velikim brojem (10-120) timocita (De Waal i Rademakers, 1997). TEC korteksa (cTEC) ispoljavaju MHC (engl. major histocompatibility complex, glavni kompleks tkivne podudarnosti) molekule klase I i II i pokazuju izraženu sekretornu sposobnost (Rezzani i sar., 2008). Epitelnim ćelijama korteksa timusa pripada i subpopulacija koja ispoljava proteinski genski produkt 9.5, obeležje timusnih ćelija „dadija“ (engl. thymic nurse cells) (Brelinska, 2003), koje procesom emperipoleze „obuhvataju“ timocite u citoplazmatske vakuole i kojima se pripisivala uloga u pozitivnoj selekciji (Boyd i sar., 1993). Medularne TEC (mTEC) su „gušće“ raspoređene, odlikuju se većim sadržajem citoplazme i kraćim nastavcima i ostvaruju kontakt sa manjim brojem timocita (Toussaint-Demyllé i sar., 1990). U okviru mTEC, izdvajaju se dve subpopulacije ćelija (Farr i sar., 2002; Brelinska, 2003), od kojih su jedne nezrele ćelije, raspoređene na obodu medule (1% mTEC), a druge zrele ćelije poligonalnog oblika i guste citoplazme, koje intenzivno sintetišu peptidne hormone i ispoljavju kostimulatorne molekule, kao i autologe tkivno-specifične antigene. Timusnom epitelu medule pripadaju i Hasalova tela, korpuskularne strukture sačinjene od hipertrofičnih retikulo-epitelnih ćelija (Bodey i sar., 2000) sličnih keratinocitima. Hasalova tela su metabolički i transkripciono aktivna, i produkuju veliki broj citokina i površinskih molekula (Zaitseva i sar., 2002), kojima uspostavljaju aktivnu komunikaciju sa timocitima i antigen-prezentujućim ćelijama (Rezzani i sar., 2008). Noviji podaci ukazuju na njihov značaj u sazrevanju regulatornih T-ćelija u timusu (Takahama, 2006; Rezzani i sar., 2008).

Utvrđeno je da TEC pokazuju heterogenost i na ultrastrukturnom nivou (van de Wijngaert i sar., 1984). Prema ultrastrukturnim karakteristikama, TEC se mogu klasifikovati u bar šest tipova ćelija (van de Wijngaert i sar., 1984). Ćelije tipa 1 su locirane supkapsularno i perivaskularno i uspostavljaju direktan kontakt sa bližim TEC tipa 2 spoljašnjeg korteksa. Uz ćelije tipa 2, smeštene su nešto tamnije ćelije tipa 3 i tamne ćelije tipa 4 koje pripadaju dubokom korteksu. TEC tipa 2 i 3 pokazuju izrazitu metaboličku aktivnost, i najverovatnije sadrže prekursore ćelija „dadilja“. Ćelije tipa 4, sa jedrom vretenastog oblika, imaju odlike umirućih ćelija (Boyd i sar., 1993). U meduli su, pre svega, uočene TEC tipa 5 koje pokazuju veliki stepen sličnosti sa TEC tipa 1, sa kojima su i fizički povezane putem vezivnih pregrada (Boyd i sar., 1993). Ćelije tipa 6 su vezane za Hasalova tela. Postulirano je da svi tipovi TEC nastaju od zajedničkog prekursora endodermalnog porekla (Le Douarin i Jotereau, 1975; Gill i sar., 2003), pod kontrolom Foxn1 faktora (engl. forkhead box N1, proizvod nude gena), značajnog za započinjanje ali i održavanje diferencijacije ovih ćelija (Gill i sar., 2003; Su i sar., 2003). U odsustvu ovog faktora, TEC ispoljavaju karakteristike retke i specifične populacije progenitorskih mTEC (Blackburn i sar., 1996). Ove ćelije ispoljavaju citokeratine (K) 5 i 8, i mogu samostalno formirati potpuno funkcionalan timus (Bennett i sar., 2002). Pod uticajem Foxn1 faktora, između 11. i 12. dana gestacije, primordijalne TEC započinju diferencijaciju ka K5+K8+ i K5-K8+ cTEC, i zatim ka K5+K8- mTEC (Bennett i sar., 2002; Gill i sar., 2002; Klug i sar., 2002). Za njihovu diferencijaciju u zrele cTEC i mTEC je neophodno prisustvo timocita i N-terminalnog domena Foxn1 faktora (Su i sar., 2003).

Uz Foxn1, rane faze razvoja timusnog rudimenta zavise od koordiniranog delovanja čitavog niza transkripcionih faktora, kao što su Hoxa3 (engl. homeobox A3), Pax1 (engl. paired box gene), Pax9, Eya1 (engl. eyes absent 1 homologue) i Six1 (engl. sine oculis-related homeobox 1 homologue)] (Anderson i Jenkinson, 2001; Blackburn i Manley, 2004), kao i signalnih molekula generalno uključenih u procese razvoja, poput elemenata Wnt (engl. wntless-type) signalnog puta (Blackburn i Manley, 2004).

1.1.1.1.2. Timusne makrofage (MF)

Timusne MF predstavljaju izuzetno heterogenu populaciju ćelija, različitih fenotipskih i ultrastrukturnih osobnosti, koja neseljava sve osnovne odeljke timusa

(Boyd i sar., 1993). Pretpostavljeno je da je fagocitoza ključna funkcija MF u timusu (Kendall, 1990; 1991; Pearse, 2006). Zaista, primenom glukokortikoida ili anti-CD3 antitela dolazi do izražene apoptoze nezrelih timocita miša u korteksu, pri čemu je daleko najveći broj apoptotskih timocita detektovan upravo u unutrašnjosti MF (Fehsel i sar., 1994; Surh i Sprent, 1994; Odaka i Mizuochi, 2002). Sugerisano je i da MF mogu delovati na proliferaciju, diferencijaciju i sazrevanje timocita putem prezentacije antigena i produkcije citokina [interleukin (IL)-1, IL-2, IL-4, faktor nekroze tumora- α (engl. tumour necrosis factor- α , TNF- α), interferon- γ (IFN- γ)] (Kendall, 1991). U timusu pacova, pored velikih MF korteksa i medule, okruglog oblika, koje ispoljavaju ED1 (CD68) molekul i aktivne su u fagocitozi, postoji i grupa velikih MF dendritske morfologije, bez fagocitne sposobnosti, koje ispoljavaju ED2 (CD163) antigen (Sommandas i sar., 2007). Ove ćelije pokazuju izraženu sposobnost stimulacije timocita korteksa, i „spasavanja“ CD4+CD8+ dvostruko pozitivnih (engl. double positive, DP) ćelija od apoptoze (Sommandas i sar., 2007).

1.1.1.1.3 Timusne dendritske ćelije (DC)

Dendritske ćelije se u timusu uočavaju uglavnom u meduli i u nivou KMS i čine 0.5% svih ćelija timusa (Ardavin, 1997; Bendriss-Vermare i sar., 2001). Generalno, DC su heterogena populacija, u smislu porekla, fenotipa i funkcije (Wu i Shortman, 2005). Kod pacova se DC mogu svrstati u tri subpopulacije ćelija (Voisine i sar., 2002; Hubert i sar., 2004). Dve subpopulacije čine konvencionalne DC mijeloidne morfologije, i to CD4⁻MHCII⁺CD11b⁺OX62⁺ i CD4⁺MHCII⁺CD11b⁺OX62⁺. Trećoj subpopulaciji pripadaju plazmacitoidne DC heterogene morfologije, koje pokazuju CD4⁺MHCII⁺CD11b⁻OX62⁻CD45R⁺ fenotip. Slično je i kod miša, s tim što subpopulacije ovih ćelija pokazuju drugačije fenotipske karakteristike. Konvencionalne DC ispoljavaju CD11c molekul, i njima, prema fenotipskim karakteristikama, pripadaju CD11b⁻CD8 α ⁺CD172a⁻ i CD11b⁺CD8 α ^{+/+}CD172a⁺ ćelije. Treću subpopulaciju čine plazmacitoidne CD45RA⁺ DC, sa nešto nižim nivoom ispoljavanja CD11c antigena (Wu i Shortman, 2005). Konvencionalne CD11b⁻ DC nastaju u samom timusu miša i čine oko 60% svih DC u ovom organu, dok CD11b⁺ konvencionalne i plazmacitoidne DC predstavljaju imigrante sa periferije (Li i sar., 2009). Konvencionalne CD11b⁻ DC su, zahvaljujući svojim karakteristikama specijalizovanih antigen-prezentujućih ćelija,

uključene u održavanje tolerancije na sopstvene antigene, kroz negativnu selekciju (Klein i sar., 2009) i selekciju T-ćelija regulatornog fenotipa (Watanabe i sar., 2005). Smatra se da je uloga konvencionalnih CD11b⁺ DC sa periferije slična onoj koju pokazuju CD11b⁻ ćelije, pri čemu bi one mogle biti izvor tkivno specifičnih antigena koji se u timusu ne ispoljavaju, ili uobičajenih antigena poreklom iz hrane ili flore gastrointestinalnog sistema (Klein i sar., 2009). Uloga plazmacitoidnih DC u sazrevanju timocita nije razjašnjena (Wu i Shortman, 2005).

Stromi timusa pripadaju i retke mioidne ćelije, prisutne samo u meduli (Pearse, 2006), hematopoetske ćelije (eozinofili, neutrofilni, B-ćelije, plazmociti, mastociti i eritroidne ćelije) i fibroblasti (Kendall, 1991). Važnu komponentu timusne strome predstavlja i mreža vanćelijskih molekula (engl. extracellular matrix), sastavljena od kolagena, retikulinskih vlakana, glikozaminoglikana i glikoproteina (Boyd i sar., 1993). Zajedno sa mezenhimalnim ćelijama timusa od kojih prevashodno potiče, smatra se da ova komponenta strome ima ulogu u sazrevanju timocita (Anderson i Jenkinson, 2001).

1.1.2. Diferencijacija i sazrevanje T-limfocita u timusu

Timus predstavlja kompleks visoko specijalizovanih stromalnih mikrookruženja sposobnih da podrže razvoj ćelija poreklom od hematopoetske matične ćelije (engl. hematopoietic stem cell, HSC) kostne srži, ili fetalne jetre, u pravcu zrelih T-limfocita. Kod miša, dve subpopulacije HSC poseduju potencijal diferencijacije ka timocitima. 1) multipotentne progenitorske ćelije, koje imaju potencijal razvoja ka mijeloidnim, kao i limfoidnim ćelijama. 2) limfoidne rodonačelne ćelije (engl. common lymphoid progenitor, CLP), bez mijeloidnog razvojnog potencijala (Karsunky i sar., 2008), kojima pripadaju CLP-1 (lin⁻Sca-1⁺CD117^{+/-}CD127⁺CD135⁺) (Kondo i sar., 1997) i CLP-2 (lin⁻Sca-1⁺CD117⁻CD127⁺CD135⁺B220⁺) (Martin i sar., 2003) frakcije ćelija, pri čemu su CLP-2 najdiferenciranija frakcija sa potencijalom razvoja T-ćelija (Martin i sar., 2003). Svi opisani tipovi ćelija se mogu diferencirati u rane progenitore T-ćelijske loze (engl. early T-lineage progenitor, ETP) (Adolfsson i sar., 2001; Martin i sar., 2003), ali se smatra da su CLP jedini neposredni izvor ETP ćelija koje se sreću u timusu (Vicente i sar., 2010). Razvoj nezrelih T-limfocita (timocita) podrazumeva stalne promene fenotipskih, genetičkih i funkcionalnih karakteristika (Bommhardt i sar.,

2004), pri čemu se pojedini stadijumi sazrevanja definišu na osnovu specifičnog redosleda ispoljavanja površinskih antigena.

1.1.2.1 Rani stadijumi sazrevanja timocita

Prekursori iz kostne srži do timusa dospevaju krvotokom, pod uticajem hemoatraktanata, i to CC-hemokinskih liganada (engl. CC-chemokine ligand, CCL) na endotelu timusa i odgovarajućih CC-hemokinskih receptora (engl. CC-chemokine receptor, CCR) na prekursorima timocita. Pokazano je da CCL19-CCL21/CCR7, CCL25/CCR9 i P-selektin/PGSL1 (engl. platelet-selectin glycoprotein ligand 1) parovi molekula igraju ulogu u naseljavanju timusa limfoidnim progenitorima (Takahama, 2006; Vicente i sar., 2010). Naseljavanje timusa se odvija periodično, u razmacima od 3 do 5 nedelja kod odraslih miševa (Foss i sar., 2001), pri čemu povišeno ispoljavanje liganada poput CCL25 hemokina i P-selektina odgovara periodima pogodnim za ulazak timocitnih prekursora (Gossens i sar., 2009). Razvojni koraci najnezrelijih CD4-CD8- (engl. double negative, DN) timocita, koji na membrani ne ispoljavaju nijedan od koreceptora su najdetaljnije proučeni kod miša, i okarakterisani su na osnovu sukcesivnih promena u površinskom ispoljavanju CD44 i CD25 (α -lanac receptora za IL-2) molekula (Godfrey i sar., 1993).

CD44⁺CD25⁻ timociti (DN1) predstavljaju najraniji stadijum u sazrevanju i distribuirani su u nivou KMS, u blizini mesta ulaska u timus, te upravo ovoj subpopulaciji pripadaju ETP ćelije (Allman i sar., 2003). U pitanju su timociti lin⁻CD44⁺CD25⁻Sca-1⁺c-kit⁺ fenotipa, koje karakteriše nisko ispoljavanje α -lanca receptora za IL-7 (IL-7R α) (Vicente i sar., 2010). Ćelije u DN1 fazi razvoja imaju potencijal razvoja ka B-ćelijama, MF, DC i urođenoubilačkim (engl. natural killer, NK) ćelijama (Naito i sar., 2011). Aktivacija Notch signalnog puta u ovim timocitima, posredstvom DL4 (engl. delta-like 4) liganda ispoljenog na TEC, suzbija B-ćelijski razvojni potencijal i ključna je za potpuno opredeljenje ka T-ćelijskoj liniji i dalji razvoj ovih ćelija (Hozumi i sar., 2008; Koch i sar., 2008).

CD44⁺CD25⁺ timociti (DN2), raspoređeni kroz čitav korteks timusa, više nemaju potencijal razvoja u pravcu B-ćelija, ali i dalje poseduju sposobnost razvoja ka MF, DC i NK ćelijama (Naito i sar., 2011). U ovoj fazi diferencijacije, geni koji kodiraju lance T-ćelijskog receptora (engl. T-cell receptor, TCR) su i dalje u zametnoj

konfiguraciji. DN2 ćelije počinju ispoljavanje IL-7R α , čime postaju podložne delovanju IL-7, koji je (uz Notch protein) ključan u preživljavanju (Hong i sar., 2012), pre svega u narednoj DN3 fazi diferencijacije (von Freeden-Jeffry i sar., 1997). Smatra se da DN2 stadijum razvoja ima ulogu važne kontrolne tačke u timopoezi, budući da je ekspresija transkripcionog faktora Bcl11b u ovoj fazi nužna za konačno opredeljenje za razvoj u T-ćelije i zadobijanje DN3 fenotipa (Naito i sar., 2011).

CD44-CD25⁺ timociti (DN3) nastaju usled dramatičnog smanjenja ispoljavanja CD44 molekula. Ćelije ovog fenotipa su raspoređene isključivo u supkapsularnom regionu timusa (Ladi i sar., 2006) i njihov broj direktno određuje kapacitet timusa za prihvatanje timocitnih prekursora (Prockop i Petrie, 2004). U DN3 fazi razvoja započinje ekspresija RAG-1 i RAG-2 (engl. recombination activating gene) gena. Produkti RAG gena, u procesu V(D)J rekombinacije (Nagaoka i sar., 2000; Oltz, 2001), katalizuju somatsku rekombinaciju gena koji kodiraju β -, γ - i δ -lance TCR-a (Starr i sar., 2003).

Apsolutni preduslov za dalji razvoj i sazrevanje timocita u pravcu glavne loze $\alpha\beta$ -T-limfocita, je uspešna rekombinacija i ekspresija gena za β -lanac TCR-a, da bi ćelije na membrani ispoljile β -lanac TCR-a, zamenski pre-T α lanac i CD3/ ζ molekule, u obliku pre-TCR kompleksa (Starr i sar., 2003), koji se karakteriše konstitutivnim, ligand-nezavisnim, prenosom signala (Irving i sar., 1998; Saint-Ruf i sar., 2000). Prenos signala putem pre-TCR kompleksa, poznat i kao β -selekcija, omogućava preživljavanje, zaustavljanje rekombinacije gena za β -lanac TCR-a (engl. allelic exclusion, alelsko isključivanje) i proliferaciju kasnih DN3, odnosno DN4 ćelija (4-6 ćelijskih deoba). Proliferacija i preživljavanje ovih ćelija se nalaze pod kontrolom IL-7 (Hong i sar., 2012), da bi se nakon toga sposobnost odgovora na ovaj citokin prekinula drastičnim smanjenjem ispoljavanja IL-7R α (Yu i sar., 2004). U razvoju DN3 ćelija važnu ulogu igraju Notch signalni put i E2A i HEB transkripcioni faktori iz bHLH familije (engl. basic helix-loop-helix) (Naito i sar., 2011). β -selekcija je jedna od kritičnih tačaka provere u procesu timopoeze, imajući u vidu da odsustvo pre-TCR kompleksa dovodi do apoptoze timocita (von Boehmer i sar., 1999).

CD44-CD25⁻ timociti (DN4) nastaju „gubitkom“ CD25 molekula, nakon ispoljavanja pre-TCR kompleksa na membrani. U daljoj diferencijaciji, DN4 ćelije, ispoljavaju CD8, a zatim i CD4 koreceptor i preko prelaznih stadijuma nezrelih

CD4+CD8- i CD4-CD8+ jednostruko pozitivnih (engl. immature single positive, ISP) timocita, stiču DP fenotip (Matsumoto i sar., 1991). U DN4 fazi započinje rekombinacija genskih segmenata za α -lanac TCR-a, katalizovana produktom RAG-2 gena (Nagaoka i sar., 2000).

Razvoj timocita od DN1 do DN3 stadijuma, se odvija sa migracijom ovih ćelija od KMS do supkapsularnog korteksa (Takahama, 2006), zahvaljujući receptorima za hemokine, uključujući CCR7, CCR9 i CXC-hemokinski receptor 4 (engl. CXC-chemokine receptor 4) (Plotkin i sar., 2003; Benz i sar., 2004; Misslitz i sar., 2004). Timociti DN1, DN2 i DN3 subpopulacija ostvaruju komunikaciju sa TEC, nužnu za diferencijaciju TEC i formiranje i održavanje strukture korteksa timusa (Klug i sar., 1998; 2002).

Za razliku od miša, kod drugih vrsta se karakterizacija ranih faza razvoja timocita na osnovu ekspresije CD44 i CD25 markera pokazala neuspešnom. Kod pacova, 2-3% ukupnih timocita, uglavnom najnezrelijeg CD4-CD8- DN fenotipa, ispoljava CD45RC molekul na membrani (Law i sar., 1989) i istovremeno pokazuje diferencijalno ispoljavanje CD2 antigena (Williams i sar., 1987). Postulirano je da se razvoj DN timocita pacova odvija od CD45RC+CD2-, preko CD45RC+CD2+ do CD45RC-CD2+ subpopulacije (Law i sar., 1989), pri čemu se dobra timopoetska sposobnost i regenerativni kapacitet pripisuje CD45RC+ ćelijama.

1.1.2.2. Kasni stadijumi sazrevanja timocita

Timociti DP fenotipa žive 3-4 dana (Starr i sar., 2003), i ne ulazeći u deobu gube na veličini, smanjuju ispoljavanje adhezivnih molekula i obavljaju neprekidnu somatsku rekombinaciju gena za α -lanac TCR-a (Hünig i sar., 2001). Preselekcioni DP timociti preživljavaju zahvaljujući ekspresiji Bcl-X_L antiapoptotskog faktora, pod kontrolom transkripcionih faktora ROR γ (Sun i sar., 2000) i TCF-1 i LEF-1 faktora Wnt signalnog puta (Ioannidis i sar., 2001). Za to vreme, svi genski segmenti koji pripadaju α -lokusu TCR-a mogu biti iskorišćeni, čime se povećava mogućnost ispoljavanja funkcionalnog TCR $\alpha\beta$ (Starr i sar., 2003). Ovakav program diferencijacije, ukoliko ne bude prekinut aktivacijom TCR $\alpha\beta$, završava se tzv. smrću usled zanemarivanja (engl. death by neglect), čime se uklanjaju imunološki „beskorisni“ timociti, koji ili ne ispoljavaju ili ispoljavaju nefunkcionalan TCR $\alpha\beta$ (Bommhardt i sar., 2004). Time se, takođe, oslobađa

prostor u „selekcionišama“ za timocite čiji bi TCR $\alpha\beta$ mogao biti specifično aktiviran u limfo-stromalnim interakcijama (Hünig i sar., 2001). Uspešna rekombinacija gena za α -lanac TCR-a, zaustavlja ekspresiju invarijantnog pre-T α lanca, a ćelija ispoljava nizak nivo zrelog TCR $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$ +) u kompleksu sa CD3/ ζ proteinima (Germain, 2002; Bommhardt i sar., 2004; Miosge i Zamoyska, 2007), čime nastaju DP TCR $\alpha\beta$ + timociti, koji podležu procesima selekcije (Kisielow i sar., 1988; Jameson i sar., 1995).

1.1.2.2.1. Pozitivna selekcija

Preduslov za preživljavanje i dalji razvoj DP TCR $\alpha\beta$ + timocita je efikasna interakcija njegovog TCR $\alpha\beta$ sa kompleksom MHC molekula i sopstvenog peptida na membrani TEC i DC (Bouso i sar., 2002; Li i sar., 2007). Smatra se da TCR $\alpha\beta$ i MHC-peptid interakcija niskog aviditeta (afinitet pojedinačne TCR $\alpha\beta$ – MHC-peptid interakcije \times broj interakcija po ćeliji) omogućava dugotrajno preživljavanje i dalje sazrevanje DP TCR $\alpha\beta$ + timocita (Takahama i sar., 2010). Ligandi odgovorni za ovakav tip interakcije ne aktiviraju zrele T-ćelije, već pokazuju antagonističke/delimično agonističke karakteristike u odnosu na TCR $\alpha\beta$ koji ih prepoznaje (Hogquist i sar., 1994). Signal koji DP TCR $\alpha\beta$ + ćelije primaju, prekida „program ćelijskog umiranja“, stimuliše ispoljavanje zrelog TCR $\alpha\beta$ i drugih površinskih antigena (CD28, CD5, CD69), migraciju timocita u medulu i diferencijaciju u zrele jednostruko pozitivne (JP) T-ćelije (Ashton-Rickardt i sar., 1994; Sebzda i sar., 1994; Hogquist i sar., 1994; Hünig i sar., 2001; Starr i sar., 2003). Ovaj proces se naziva pozitivnom selekcijom i traje nekoliko dana (Starr i sar., 2003), uz neprekidno prisustvo signala koje prenosi TCR $\alpha\beta$ (Wilkinson i sar., 1995). Pozitivna selekcija podrazumeva i ponovno ispoljavanje IL-7R α na membrani timocita, čime im IL-7 ponovo postaje dostupan kao faktor preživljavanja (Hong i sar., 2012) i linijskog usmeravanja (Brugnera i sar., 2000; Park i sar., 2010).

Kako je pozitivna selekcija ključno zavisna od TCR $\alpha\beta$ -zavisnog signala, funkcionisanje elemenata signalnog puta ovog receptora je preduslov za njeno uspešno odvijanje. Protein kinaze iz Src (Lck i Fyn) i Syk (ZAP-70, engl. 70-kD ζ -associated protein) familija su kritični faktori pozitivne selekcije (Starr i sar., 2003). I „adapterski proteini“ (engl. adapter proteins), uključeni u interakciju sa različitim efektorskim

molekulima (Alshamsan, 2011), poput LAT (engl. linker for activation of T cells) proteina, određuju odgovor ćelija na signale selekcije (Palmer, 2003; Werlen i sar., 2003). Posredstvom LAT proteina, fofolipaze C γ i odgovarajućih sekundarnih glasnika (inozitol-1,4,5 trifosfat i 1,2-diacilglicerol), aktiviraju se transkripcioni faktori NFAT (engl. nuclear factor of activated T cells) familije i signalni put mitogenom aktiviranih protein kinaza (engl. mitogen-activated protein kinase, MAPK) (Alshamsan, 2011), koji bitno određuju ishod pozitivne selekcije (Miyazaki i Lemmonier, 1998; Oukka i sar., 1998). Različiti transkripcioni faktori, poput bHLH familije (Quong i sar., 2002), takođe igraju važnu ulogu u pozitivnoj selekciji timocita.

1.1.2.2. Negativna selekcija

Negativna selekcija (klonska delecija; engl. clonal deletion) podrazumeva apoptotsko uklanjanje timocita usled TCR $\alpha\beta$ – MHC-peptid interakcije visokog aviditeta (Ahn i sar., 2008; McCaughtry i sar., 2008). Za ovakav tip interakcije odgovorni su tzv. agonistički peptidi, koji mogu izazvati aktivaciju zrelih T-ćelija. Iako se može odigrati već u DP stadijumu razvoja (Takahama, 2006), klonska delecija JP timocita, tokom postselekcione diferencijacije u meduli, je osnovni mehanizam uklanjanja potencijalne autoreaktivnosti iz ukupnog repertoara specifičnosti prepoznavanja antigena, odnosno centralne tolerancije (Klein i sar., 2009; Metzger i Anderson, 2011).

Ključan faktor klonske delecije je ektopično ispoljavanje stotina do hiljada tkivno specifičnih antigena (engl. tissue restricted antigens, TRA) u mTEC, pod kontrolom specifičnog transkripcionog faktora AIRE (engl. autoimmune regulator) (Kyewski i Klein, 2006), poznato kao „promiskuitetna“ ekspresija gena (engl. promiscuous gene expression) (Derbinski i sar., 2001). AIRE učestvuje u protein-protein interakcijama, ima sposobnost vezivanja za DNK (Aaltonen, 1997; Nagamine i sar., 1997; Bjorses i sar., 2000), i, najverovatnije, direktno reguliše ekspresiju gena u timusu (Heino i sar., 1999). Pokazano je da je AIRE eksprimiran samo u zrelih mTEC miša, (Derbinski i sar., 2005), dok „promiskuitetna“ genska ekspresija nije uočena u cTEC, CD11c⁺ timusnim DC, niti u F4/80⁺ MF (Derbinski i sar., 2001). Zrele mTEC ispoljavaju čitav niz antigena, uključujući MHC molekule klase II, CD30L, CD80, CD86 i ICAM1 (engl. intercellular adhesion molecule), pa usled pune sposobnosti

prezentacije antigena (Derbinski i sar., 2005) mogu obavljati klonsku deleciju CD4-CD8+ (Gallegos i Bevan, 2004) i CD4+CD8- (Klein i sar., 2001) JP timocita. Efikasan promet mTEC (Gabler i sar., 2007; Gray i sar., 2007) i niska učestalost ispoljavanja bilo kog tkivno specifičnog antigena u njihovoj ukupnoj populaciji, uz izuzetnu efikasnost negativne selekcije, sugerisali su postojanje dodatnih mehanizama antigenske prezentacije u meduli. U *in vivo* uslovima postoji jednosmeran prenos tkivno specifičnih antigena iz svih relevantnih ćelijskih odeljaka mTEC ka DC (Koble i Kyewski, 2009), da bi na njihovoj membrani bili efikasno prikazani u sklopu MHC molekula klase I i II (Klein i sar., 2009; Koble i Kyewski, 2009; Metzger i Anderson, 2011), sugerišući i važnu ulogu DC u klonskoj deleciji. Produžen boravak zrelih timocita u meduli, povećavajući verovatnoću prepoznavanja retko ispoljenih sopstvenih antigena, bi, takođe, mogao doprineti visokoj efikasnosti negativne selekcije (Klein, 2009).

Opšti putevi indukcije apoptoze, aktivacijom membranskih receptora (receptor za faktor nekroze tumora, TNFR; Fas receptor, CD95) ili članova familije Bcl-2 faktora i kaspaze 9 (Zheng i Flavell, 2000), se ranije nisu mogli povezati sa negativnom selekcijom (Sentman i sar., 1991; Nagata, 1997). Ipak, danas se zna da ekspresija proapoptoskog BIM proteina (engl. BH-3-only, član Bcl-2 familije), predstavlja nužan faktor negativne selekcije (Moran i Hogquist, 2012). Pored toga, pokazano je da i LAT protein, u interakciji sa Grb2 adaptorskim proteinom, i aktivacijom JNK (engl. c-Jun NH2-terminal kinase) i p38 kinaza MAPK familije (Alshamsan, 2011), učestvuje i u negativnoj selekciji (Sugawara i sar., 1998; Sabapathy i sar., 2001). Važna uloga se pripisuje i kostimulatornim molekulima, poput CD28 (Punt i sar., 1994) i transkripcionim faktorima, poput Nur77 (Starr i sar., 2003). Konačno, nedavno je postulirano da ligandi pozitivne i negativne selekcije, različitim signalnim putevima, kroz različitu kinetiku aktivacije ERK kinaze iz MAPK familije, usmeravaju ćeliju ka pozitivnoj ili negativnoj selekciji (Alshamsan, 2011).

1.1.2.2.3. Modeli selekcije timocita

Istorijski, pre važećeg afinitetno-aviditetnog modela (Takahama i sar., 2010), predloženo je više mehanizama selekcije timocita. Prema modelu „izmenjenog peptida“, različiti ligandi posreduju u pozitivnoj i negativnoj selekciji, pri čemu pozitivnu selekciju obezbeđuju specifični peptidi ispoljeni isključivo u timusu (Marrack i Kappler,

1987). Dalje, aviditetni, afinitetni i kinetički model postuliraju da su ukupna jačina (Palmer, 2003; Werlen i sar., 2003), pojedinačan afinitet, „kvalitet“, (Faro i sar., 2004; Palmer, 2003; Werlen i sar., 2003) i trajanje (Hlavacek i sar., 2002; Palmer, 2003; Werlen i sar., 2003) TCR $\alpha\beta$ – MHC-peptid interakcije ključni faktori u određivanju ishoda selekcije timocita. Međutim, pokazalo se da su forme enzima uključenih u obradu peptida koji će biti prezentovani na membrani cTEC jedinstveni za timus (Nakagawa i sar., 1998; Gommeaux i sar., 2009; Murata i sar., 2007). Drugim rečima, antigeni ispoljeni u korteksu timusa zaista imaju drugačiju prirodu u odnosu na bilo koji drugi organ (Nitta i sar., 2010), što, u izvesnoj meri, „oživljava“ model „izmenjenih peptida“, koji je uglavnom napušten. Dakle, najverovatnije objašnjenje mehanizama selekcije T-ćelija, sposobnih za prepoznavanje antigena ispoljenih u sklopu sopstvenih MHC molekula, a tolerantnih prema sopstvenim antigenima, će podrazumevati fuziju elemenata postojećih modela, kao i razvoj novih i proširenje postojećih eksperimentalnih pristupa ovom problemu (Moran i Hogquist, 2012).

1.1.2.2.4. Linijsko usmeravanje

Uspešna pozitivna selekcija podrazumeva i tzv. linijsko usmeravanje, koje određuje dalji razvoj bipotencijalnih DP ćelija. Po pravilu, timociti čiji TCR $\alpha\beta$ prepoznaje MHC molekule klase II nastavljaju razvoj ka CD4+CD8- JP fenotipu, dok prepoznavanje MHC molekula klase I usmerava razvoj ka CD4-CD8+ JP fenotipu (Singer i sar., 2008). Modeli linijskog usmeravanja uključuju stohastički model nasumičnog ukidanja ekspresije gena za jedan od koreceptora (Chan i sar., 1993; Davis i sar., 1993; Chan i sar., 1994) i niz instruktivnih modela, specifičnog prekida ispoljavanja neodgovarajućeg koreceptorskog molekula (Seong i sar., 1992; Itano i sar., 1996; Yasutomo i sar., 2000). Eksperimentalno uporište ima samo kinetički model, koji linijsko usmeravanje vezuje za trajanje TCR $\alpha\beta$ -zavisnog signala, pri čemu „informaciju“ o njegovom trajanju ćeliji prenose citokini iz familije sa zajedničkim γ lancem, poput IL-7 (Brugnera i sar., 2000; Singer, 2002). Nakon pozitivne selekcije, DP ćelije zadobijaju prelazni CD4+CD8- fenotip, smanjenjem ekspresije gena za CD8 koreceptor. Ukoliko je pozitivna selekcija bila posredovana MHC molekulom klase II, signal koji prenosi TCR $\alpha\beta$ ostaje prisutan i usmerava ćeliju ka zreom CD4+CD8- JP fenotipu. U slučaju pozitivne selekcije posredovane MHC molekulom klase I, signal sa

TCR $\alpha\beta$ postepeno slabi, što će dovesti do prestanka ekspresije gena za CD4 i ponovnog pokretanja ekspresije gena za CD8 koreceptor i diferencijacije ka zreloom CD4-CD8+ fenotipu, u prisustvu IL-7 (Singer i sar., 2008). Čitav sled događaja je kontrolisan nizom transkripcionih faktora, uključujući Th-POK (engl. T-helper-inducing POZ/Kruppel-like factor), RUNX3 (runt-related transcription factor 3), TOX (thymus high-mobility group box protein) i GATA3 (GATA-binding protein 3) (Singer i sar., 2008).

1.1.2.2.5. Postselekciona proliferacija

Nakon pozitivne selekcije i linijskog usmeravanja, timociti započinju aktivnu migraciju iz korteksa u medulu timusa, usled ispoljavanja hemokinskog receptora CCR7, čiji su ligandi (CCL19 i CCL21) ispoljeni na mTEC postnatalnog timusa (Ueno i sar., 2004). Prema različitim izvorima, timociti se u meduli zadržavaju od 4 do 5 dana (McCaughy i sar., 2007), pa čak do dve nedelje (Anderson i Jenkinson, 2001) i podležu postselekcionalnoj diferencijaciji, praćenju promenama u ispoljavanju niza antigena na membrani ćelija, uključujući CD24, Qa-2, CD62L, CD69 i 3G1 (Gabor i sar., 1997; Ge i Chen, 1999). Novonastali funkcionalno nezreli JP timociti ispoljavaju nizak nivo CD62L i visok nivo CD69 antigena i diferenciraju se u funkcionalno zrele T-ćelije, koje na membrani ispoljavaju nisku gustinu CD69 i visoku gustinu CD62L antigena (Reichert i sar., 1986; Ramsdell i sar., 1991; Bendelac i sar., 1992). Pre napuštanja timusa, zreli timociti ulaze u tzv. postselekcionalnu proliferaciju, od bar šest ćelijskih deoba, koja zavisi od mTEC (Lucas i sar., 1994; Ernst i sar., 1995; Hare i sar., 1998) i prisustva IL-7 (Hare i sar., 1998).

1.1.2.3. Sazrevanje prirodnih regulatornih CD4+CD25+Foxp3+ T-ćelija

Uz negativnu selekciju autoreaktivnosti u timusu (tzv. recesivna tolerancija), prikupljeni su dokazi o „dominantnom“ mehanizmu tolerancije, odnosno aktivne inhibicije autoreaktivnosti, koju obezbeđuju specijalizovane subpopulacije regulatornih T-ćelija (Hori i Sakaguchi, 2004). Poznate su bar tri specifične populacije ovakvih T-limfocita: CD4+CD25+Foxp3+ T-ćelije, TCR $\alpha\beta$ +NK1.1+ (CD161+) prirodne urođenoubilačke T-ćelije (engl. natural killer T cells, NKT), i TCR $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\alpha$ + intraepitelne T-ćelije gastrointestinalnog trakta. Svi navedeni tipovi ćelija pokazuju

fenotip aktiviranih ćelija, dok je njihova selekcija posredovana sopstvenim antigenom agonističkih karakteristika (Starr i sar., 2003).

Najbolje okarakterisanu subpopulaciju predstavljaju tzv. prirodne regulatorne CD4+CD25+ T-ćelije (engl. naturally arising regulatory T cells, Treg) koje sazrevaju u timusu, odvajajući se od CD4+CD8- ćelijske linije kasno u timopoezi (Itoh i sar., 1999). Funkcionalno, Treg ćelije timusa inhibiraju proliferaciju T-ćelija *in vitro* i sprečavaju pojavu autoimunosti u različitim eksperimentalnim sistemima (Itoh i sar., 1999; Lan i sar., 2005). Funkcija Treg ćelija podrazumeva direktan kontakt sa „ciljnim ćelijama“, posredstvom membranskog transformišućeg faktora rasta- β (engl. transforming growth factor- β , TGF- β), LAG-3 (engl. lymphocyte activation gene-3) molekula, ili CTLA-4 (engl. cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) (Fehervari i Sakaguchi, 2004; Lan i sar., 2005). Fenotipski, jedna od osnovnih odlika ovih ćelija je konstitutivno visok nivo ispoljavanja CD25 antigena (Sakaguchi i sar., 2001). Kod pacova, ispoljavanje CD25 molekula na membrani timocita predstavlja obeležje regulatornih CD4+ T-ćelija (Stephens i Mason, 2000). Jedinstven funkcionalni i fenotipski marker Treg ćelija je Foxp3 (engl. forkhead transcription factor Foxp3) molekul (Fehervari i Sakaguchi, 2004). Naime, indukcija Foxp3 je preduslov za sticanje regulatornog fenotipa, funkcija i, konačno, sposobnosti kontrole autoimunosti *in vivo* (Hori i sar., 2003).

Treg ćelije u timusu nastaju prevashodno u meduli (Fontenot i sar., 2005a) i njihova selekcija zahteva TCR $\alpha\beta$ – MHC-peptid interakciju čiji se aviditet nalazi između onog koji obezbeđuje pozitivnu i onog koji obezbeđuje negativnu selekciju (Simons i sar., 2010). Pokazano je da smanjenje efikasnosti antigenske prezentacije u mTEC smanjuje negativnu selekciju timocita i povećava produkciju Treg ćelija u timusu (Hinterberger i sar., 2010). Smatra se da diferencijacija Treg ćelija u timusu nije ograničena na jedan tip antigen-prezentujućih ćelija (Klein i Jovanovic, 2011). Selekcija Treg ćelija u timusu uključuje dva koraka, i to prepoznavanje sopstvenog peptida visokim aviditetom (TCR $\alpha\beta$ -zavisna, „instruktivna“ faza), i ekspresiju Foxp3 faktora i zadobijanje regulatornog fenotipa pod uticajem citokina (TCR $\alpha\beta$ -nezavisna faza „konsolidacije“) (Burchill i sar., 2008; Lio i Hsieh, 2008). Ispoljavanje CD28 kostimulatora utiče na početne faze diferencijacije Treg ćelija (Klein i Jovanovic, 2011), dok u drugom koraku ključnu ulogu imaju citokini sa zajedničkim γ -lancem (IL-2, IL-7, IL-15) (Klein i Jovanovic, 2011). Naime, mutacije gena za zajedničke molekule ovih

signalnih puteva, odnosno γ lanac receptora za IL2 (Fontenot i sar., 2005b), Janus kinazu 3 (Mayack i sar., 2006) ili STAT5 (engl. signal transducer and activator of transcription 5 (Yao i sar., 2007), dovode do drastičnog smanjenja veličine Treg subpopulacije u timusu. Iako najveći deo Treg limfocita na periferiji potiče iz timusa (Hsieh i sar., 2006), ćelije sličnih karakteristika mogu nastati *in situ*, iz naivnih T-ćelija (adaptivne, indukovanе Treg ćelije) (Klein i Jovanovic, 2011). Najbolje su okarakterisane Treg ćelije tipa 1 (engl. T regulatory cell type 1, Tr1) i „pomoćničke“ T-ćelije tipa 3 (engl. T helper cell type 3, Th3) (Fehervari i Sakaguchi, 2004), koje deluju sekrecijom citokina IL-10 (Tr1) i TGF- β (Th3) (Lan i sar., 2005).

1.1.2.4. Sazrevanje regulatornih urođenoubilačkih T-ćelija (NKT ćelija)

Uz Treg ćelije, u timusu sazrevaju NKT ćelije (Pellicci i sar., 2002; Tilloy i sar., 1999), koje ispoljavaju antigene karakteristične za NK ćelije i T-limfocite (Engel i Kronenberg, 2012). Zrele aktivirane NKT ćelije proizvode velike količine proinflamatornih (IL-12, IFN- γ) i antiinflamatornih (IL-4, IL-13) citokina, ispoljavaju kostimulatorne molekule (Bendelac i sar., 2007; Terabe i Berzofsky, 2008) i uključene su u regulaciju različitih fizioloških i patoloških aspekata imunskog odgovora (Godfrey i Berzins, 2007). Ove ćelije kod miša ispoljavaju specifičan TCR $\alpha\beta$, sačinjen od invarijantnog α -lanca (V α 14-J α 18) kombinovanog sa nekoliko mogućih β -lanaca (V β 8.2, V β 7, V β 2), i poznate su kao NKT ćelije tipa I (Godfrey sar., 2004; Bendelac i sar., 2007), koje specifično prepoznaju glikolipidne antigene ispoljene u sastavu nepolimorfnog molekula klase I, CD1d (Engel i Kronenberg, 2012). Slične ćelije tipa II su znatno manje zastupljene i nedovoljno ispitane (Brigl i sar., 2006; Uldrich i sar., 2011).

Diferencijacija NKT ćelija se odvaja od linije razvoja kovencionalnih T-ćelija u DP stadijumu razvoja u korteksu timusa (Gapin i sar., 2001; Egawa i sar., 2005) i zavisi od ispoljavanja CD1d-glikolipid kompleksa na membrani DP timocita (Wei i sar., 2005). Najverovatniji fiziološki ligand selekcije i aktivacije NKT ćelija je lizozomalni glikosfingolipid β -D-glukopiranozilceramid, koji je detektovan u timusu i slezini miša (Brennan i sar., 2011). Tradicionalno, razvoj NKT ćelija u timusu miša se prati na osnovu ispoljavanja TCR $\alpha\beta$ i NK1.1 antigena NK ćelija, i teče od NK1.1- ka NK1.1+ fenotipu (Benlagha i sar., 2002; Gadue i Stein, 2002; Pellicci i sar., 2002).

Diferencijacija NKT ćelija podrazumeva dva koraka (Godfrey i Berzins, 2007), i to pozitivnu selekciju DP timocita kao rezultat TCR $\alpha\beta$ – CD1d-glikolipid interakcije praćenu postselekcijom proliferacijom (Benlagha i sar., 2002) i ushodnu regulaciju ispoljavanja NK1.1 antigena, uz funkcijske i fenotipske promene, uključujući povećano ispoljavanje niza površinskih receptora, poput CD69 i CD122 (Gapin i sar., 2001; Gadue i Stein, 2002; Matsuda i sar., 2006). Kako prisustvo jakog agonističkog signala tokom diferencijacije sprečava dalji razvoj NKT ćelija (Chun i sar., 2003; Pellicci i sar., 2003), smatra se da i ove ćelije podležu negativnoj selekciji u kojoj ključnu ulogu imaju timociti (Schümann i sar., 2005), mada ni učešće ćelija strome timusa nije isključeno (Chun i sar., 2003).

Pokazano je da niz transkripcionih faktora [familija nuklearnog faktora κ B (NF- κ B), VDR (engl. vitamin D receptor), T-bet (engl. T box factor)], citokina (IL-15 i TGF- β) i površinskih molekula DP timocita [CD28, ICOS (engl. inducible T-cell costimulator), SLAM (engl. signalling lymphocyte activation molecule) familija receptora] igra važnu ulogu u difrencijaciji NKT ćelija (Das i sar., 2010; Godfrey i sar., 2010; Engel i Kornenberg, 2012). Za razliku od čoveka i miša gde NKT ćelije pokazuju fenotipsku raznovrsnost, kod pacova ove ćelije pokazuju skoro isključivo CD4-CD8⁺ fenotip (Matsuura i sar., 2000; Godfrey i Berzins, 2007; Godfrey i sar., 2010).

1.1.2.5. Sveži timusni emigranti

Nakon funkcionalnog sazrevanja, izlazak zrelih JP ćelija iz timusa se obavlja kroz perivaskularne prostore, koji timocite usmeravaju ka postkapilarnim venulama, arteriolama i limfnim sudovima (Ushiki, 1986; Kato, 1997). Tokom sazrevanja DP timocita u JP stadijume razvoja, transkripcioni faktor KLF2 (engl. Krüppel-like factor 2) (Carlson i sar., 2006) pokreće ispoljavanje receptora 1 za sfingozin-1-fosfat (engl. sphingosine-1-phosphate receptor 1) (Allende i sar., 2004; Matloubian i sar., 2004), ključnog za izlazak zrelih timocita na periferiju, kod odraslih miševa (Matloubian i sar., 2004). Predložena je i uloga hemokina, poput CXCL12 u izlasku timocita na periferiju (Poznansky i sar., 2002). Približno 1-5% ukupnih timocita svakog dana napusti timus (Scollay i Godfrey, 1995), i te ćelije se nazivaju svežim timusnim emigrantima (engl. recent thymis emigrants, RTE). Ove ćelije do odraslog doba predstavljaju značajan deo periferne populacije T-ćelija (Hale i sar., 2006; Vrisekoop i sar, 2008) i doprinose

formiranju, odnosno širenju repertoara specifičnosti T-ćelija (Yager i sar., 2008), kao i održavanju efikasnosti imunskog odgovora (Fink i Hendricks, 2011). Prema najnovijim podacima, RTE postaju deo frakcije naivnih ćelija za tri nedelje (Houston i sar., 2012), procesom fenotipskog i funkcionalnog sazrevanja u sekundarnim limfoidnim organima (Fink i Hendricks, 2011), pod uticajem DC (Houston i sar., 2012). Međutim, mehanizam ovog procesa nije poznat. Za razliku od miša i čoveka, kod kojih se RTE identifikuju indirektno (Boursalian i sar., 2004; Dion i sar., 2007), kod pacova je moguća fenotipska identifikacija ovih ćelija (Hosseinzadeh i Goldschneider, 1993). Naime, pokazano je da ove ćelije kod pacova ispoljavaju CD90 antigen, ali ne i CD45RC antigen (Hosseinzadeh i Goldschneider, 1993).

1.2. KATEHOLAMINI U TIMUSU

1.2.1. Komunikacija između centralnog nervnog i imunskog sistema

Dugo se smatralo da je imunski sistem funkcijski nezavisan od uticaja neuroendokrinog sistema (Friedman i Irwin, 1997) i da je njegova aktivnost regulisana samo mehanizmima imanentnim imunskim ćelijama (Kin i Sanders, 2006). Danas se zna da postoji živa dvosmerna komunikacija između centralnog nervnog i imunskog sistema (Friedman i Irwin, 1997). Centralni nervni sistem ostvaruje komunikaciju sa imunskim sistemom endokrinim putem i simpatičkim nervnim vlaknima. Endokrini put komunikacije uključuje u prvom redu hipotalamus, odnosno kortikotropni oslobađajući hormon, adrenokortikotropni hormon i koru nadbubrežnih žlezda (glukokortikoidni hormoni) (Ashwell i sar., 2000; Padgett i Glaser, 2003). Drugi put komunikacije obezbeđuju simpatička noradrenergička nervna vlakna koja inervišu organe imunskog sistema i nalaze se pod regulatornim uticajem noradrenergičkih neurona lokusa ceruleusa (Madden i sar., 1995; Elenkov i sar., 2000; Mignini i sar., 2003). Sa druge strane, ćelije imunskog sistema, sekretujući citokine, utiču na aktivnost centralnog nervnog sistema. Delujući na receptore za citokine ispoljene na simpatičkim ganglionima i nervnim vlaknima, citokini mogu uticati na aferentne signalne puteve i/ili aktivnost eferentnih nervnih vlakana i otpuštanje neurotransmitera na periferiji (Kohm i Sanders, 2001). Funkcija centralnog nervnog sistema može biti i direktno modulirana citokinima, koji sa periferije specifičnim transportnim sistemima prolaze kroz krvno-moždanu barijeru (Banks i sar., 1991; Gutierrez i sar., 1993), ili se sintetisu *in situ*, u

aktiviranim ćelijama imunskog sistema koje, u izvesnim okolnostima, i same mogu proći kroz ovu barijeru (Weller i sar., 1996). U komunikaciji između centralnog nervnog i imunskog sistema timus ima čvornu ulogu, budući da informacije iz centralnog nervnog sistema do ćelija imunskog sistema često stižu indirektno, posredstvom timusa, kao i obrnuto (Besedovsky i Del Rey, 1996).

1.2.2. Noradrenergička inervacija timusa

Prve podatke o simpatičkoj inervaciji timusa dali su Bulloch i Pomerantz (1984), koji su tehnikama mikrodisekcije i aldehidom-indukovane tkivne fluorescence (engl. sucrose-phosphate-glyoxylic acid method, SPG) povezali noradrenergičku inervaciju timusa sa stelatnim i drugim malim ganglionima simpatičkog lanca grudne duplje. Kasnije, ubrizgavanje lektina vezanog za peroksidazu izolovanu iz rena u timus uočeno je da u inervaciji timusa učestvuju neuroni distribuirani od gornjeg cervikalnog gangliona do T3 cervikotorakalnog gangliona (Nance i sar., 1987). Primenom usavršene tehnike transneuronskog retrogradnog obeležavanja modifikovanim virusom besnila (engl. pseudorabies virus), uočeno je da su preganglijski neuroni od T1 do T7 segmenata, a pre svega T2 segmenta intermediolateralnog stuba kičmene moždine, uključeni u inervaciju timusa (Trotter i sar., 2007). Takođe je pokazano da su u nervnu kontrolu timusa uključeni neuroni u produženoj moždini (kaudalno jedro rafe, ventromedijalna medula, rostralna ventrolateralna medula), Varolijevom mostu (A5 grupa ćelija) i hipotalamusu (paraventrikularno jedro) (Trotter i sar., 2007), odnosno u centrima opšte regulacije autonomnih funkcija unutrašnjih organa (Strack i sar., 1989; Huang i Weiss, 1999; Cano i sar., 2001). Smatra se da u centrima opšte regulacije autonomnih funkcija postoje specifične subpopulacije neurona koje na različite načine regulišu aktivnost simpatičkih nervnih vlakana u različitim „ciljnim“ organima (Sved i sar., 2001). Shodno tome, Trotter i saradnici (2007) sugerišu postojanje grupe neurona specifične topografske organizacije ili neurohemijskog fenotipa, koja je konkretno uključena u regulaciju funkcije timusne inervacije.

Prva saznanja o distribuciji simpatičkih nervnih vlakana u timusu su dobijena primenom SPG metode, čime je odgonetnut opšti obrazac noradrenergičke inervacije timusa (Williams i Felten, 1981; Bulloch i Pomerantz, 1984; Felten i sar., 1985; Kendall i sar., 1988; Felten i Felten, 1989). Istovetni rezultati su dobijeni i specifičnim

imunohistohemijskim obeležavanjem tirozin hidroksilaze (TH), ključnog enzima u biosintezi kateholamina, koji katalizuje hidroksilaciju L-tirozina u L-dihidroksifenilalanin (prekursor dopamina), odnosno dopamin- β -hidroksilaze (DBH), enzima koji katalizuje sintezu noradrenalina iz dopamina, potvrđujući kateholaminergički, odnosno noradrenergički karakter nervnih vlakana u timusu (Vizi i sar., 1995).

Postganglijska simpatička nervna vlakna prodiru u timus iz različitih pravaca, zajedno sa krvnim sudovima (Bulloch i Pomerantz, 1984). Noradrenergička vlakna, formirajući spletove, prostiru se prevashodno duž krvnih sudova kapsule i interlobularnih vezivnih pregrada (Williams i Felten, 1981; Felten i sar., 1985; Felten i Felten, 1989; Kendall i Al-Shawaf, 1991). Noradrenergički nervni spletovi se uočavaju i u spoljašnjem korteksu (uglavnom supkapsularno), kao i u dubokom korteksu, i posebno u nivou KMS (Felten i Felten, 1989). U nivou KMS, spletovi noradrenergičkih vlakana, kao direktan produžetak gustih nervnih spletova vezivnih pregrada, se pružaju duž venskih sinusa. Od ovih spletova se odvajaju vlakna koja prodiru, uglavnom, u parenhim korteksa. Nervna vlakna u meduli se uočavaju izuzetno retko, i ona potiču, najvećim delom, od gustih nervnih spletova koji okružuju arterije i arteriole medule (Felten i Felten, 1989).

Činjenica da se pojedinačna noradrenergička nervna vlakna „slobodna“ pružaju kroz sistem vezivnih pregrada, granaju se i prodiru u parenhim korteksa i medule (Bulloch i Pomerantz, 1984; Vizi i sar., 1995), ukazala je na mogućnost direktnog imunomodulatornog delovanja noradrenalina na limfoidne i ćelije strome timusa (Elenkov i sar., 2000). U prilog ovoj tvrdnji idu dve grupe podataka. Prvo, simpatički nervni profili uspostavljaju bliske kontakte sa različitim tipovima ćelija timusa. Noradrenergički nervni profili u spoljašnjem korteksu se nalaze u veoma bliskom kontaktu sa timocitima i velikim autofluorescentnim ćelijama (Leposavić i sar., 1992), najverovatnije mastocitima i MF (Williams i Felten, 1981; Felten i Felten, 1989; Leposavić i sar., 1992). U dubokom korteksu i u meduli, nervni profili su tako pozicionirani da se nalaze u bliskom kontaktu sa TEC (Leposavić i sar., 1992). U nivou KMS, simpatički nervni profili su raspoređeni neposredno uz MF (Müller i Weihe, 1991). Konačno, mastociti u timusu „prate“ distribuciju perivaskularnih noradrenergičkih nervnih vlakana kapsule i vezivnih pregrada, i, po pravilu, nalaze se u njihovoj neposrednoj blizini (Williams i Felten, 1981; Müller i Weihe, 1991). Drugo,

kao u mnogim perifernim organima (Vizi, 1984; 2000), postganglijska nervna vlakna u timusu ne uspostavljaju klasične sinaptičke veze sa limfoidnim i ćelijama strome (Novotny i sar., 1990; Vizi i sar., 1995), već se odlikuju „nesinaptičkim“ modelom otpuštanja neurotransmitera, koji podrazumeva slobodnu difuziju neurotransmitera do odgovarajućih receptora ispoljenih na membrani „ciljnih“ ćelija (Vizi, 1984; 2000; Vizi i Labos, 1991), koje mogu biti udaljene i do 200 μ m (Vizi i sar., 1995).

1.2.3. Sinteza kateholamina u ćelijama timusa

Pod kontrolom noradrenergičkog sistema lokus ceruleusa se nalazi i sekrecija kateholamina iz hromafinih ćelija srži nadbubrežne žlezde (Elenkov i sar., 2000). U odgovoru na stimulaciju, hromafine ćelije sekretuju adrenalin (80%) i noradrenalin (20%) (Goldfien, 2001), koji pokazuju efekte istovetne onima koji nastaju usled direktne nervne stimulacije (Padgett i Glasser, 2003). Ipak, kako je koncentracija adrenalina u timusu izuzetno niska, smatra se da noradrenalin poreklom iz nervnih vlakana ima ključnu ulogu u ovom organu (Kendall i sar., 1994).

Pokazano je da neutrofilni, MF, DC i limfociti, kod čoveka i glodara (Bergquist i sar., 1994; 1997; Bergquist i Silberring, 1998; Cosentino i sar., 2002; Spengler i sar., 1994; Flierl i sar., 2007; 2009; Nakano i sar., 2009), sadrže kateholamine. Osim toga, postoje podaci koji ukazuju da limfociti periferne krvi, uključujući i T-limfocite, čoveka i glodara sintetišu kateholamine (Musso i sar., 1996; Cosentino i sar., 2002; Qiu i sar., 2005; Flierl i sar., 2008). Pokazano je da limfociti raspolažu i mehanizmima za aktivan transport dopamina (Bencsics i sar., 1997; Bergquist i sar., 1998; Basu i Dasgupta, 2000; Amenta i sar., 2001) i, najverovatnije, noradrenalina (Marino i sar., 1999, Cosentino i sar., 2003; Gordon i Barnes, 2003). Osim limfocita, utvrđeno je da kateholamine mogu preuzimati iz okruženja i/ili sintetisati i drugi tipovi ćelija imunskog sistema, kao što su MF (Flierl i sar., 2007) i DC (Nakano i sar., 2009). Konačno, pokazano je i da epitelne ćelije izolovane iz različitih organa poseduju mehanizme za sintezu i preuzimanje kateholamina (Elwan i Sakuragawa, 1997; Al-Wadei i sar., 2012). Svi prethodno navedeni podaci nužno nameću pitanje da li i nezrele T-ćelije i/ili ćelije strome timusa, sadrže kateholamine, i, ukoliko je odgovor na ovo pitanje potvrđan, da li je prisustvo hormona/neurotransmitera u ovim ćelijama posledica sinteze i/ili preuzimanja iz okruženja.

Konačno, funkcijske studije su pokazale da kateholamini sintetisani u ćelijama imunskog sistema, delujući autokrino/parakrino, ostvaruju inhibitoran uticaj na diferencijaciju, proliferaciju i sekretornu sposobnost različitih tipova ćelija imunskog sistema čoveka (Bergquist i sar., 1994; Cosentino i sar., 2007) i glodara (Spengler i sar., 1994; Engler i sar., 2005; Qiu i sar., 2005; Jiang i sar., 2009). Ovi nalazi potenciraju značaj istraživanja koja bi rasvetlila sposobnost ćelija timusa da sintetišu kateholamine.

1.2.4. β -adrenergički receptori u timusu

Generalno, kateholamini svoju funkciju ostvaruju posredstvom membranskih adrenergičkih receptora spregnutih sa G-proteinima (engl. guanine nucleotide-binding protein), koji pripadaju podfamilijama β - (β_1 , β_2 i β_3 tipovi), i α -adrenergičkih receptora (α_1 i α_2 tipovi) (Morris i Malbon, 1999). Prototip ovih receptora predstavlja β -adrenergički receptor, sa sedam hidrofobnih transmembranskih domena, vanćelijskim NH_2 i unutarćelijskim COOH domenom. Vanćelijske strukture su uključene u vezivanje liganda, dok unutarćelijske strukture obavljaju prenos signala ka G-proteinima (Morris i Malbon, 1999). Tradicionalno, prenos signala putem β -adrenergičkog receptora se smatra zavisnim od interakcije sa stimulatornim G-proteinom, sastavljenim od stimulatorne α -subjedinice ($G\alpha_s$) i $\beta\gamma$ -dimera (Morris i Malbon, 1999). Vezivanje specifičnog liganda dovodi do aktivacije G-proteina, disocijacije $G\alpha_s$, koja zatim aktivira enzim adenilat-ciklazu (AC). Aktivacija AC dovodi do akumulacije unutarćelijskog 3',5'-cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) i povećanja aktivnosti cAMP-zavisne protein kinaze A (PKA) (Kobilka, 1992; Meinkoth i sar., 1993; Morris i Malbon, 1999), koja fosforilacijom reguliše aktivnost niza proteina, uključujući i transkripcione faktore, poput NF- κ B.

U ćelijama imunskog sistema, stimulacija β -adrenergičkih receptora može aktivirati i druge efektorske molekule, poput protein kinaze C, koja stimuliše MAPK signalni put ili aktivnost Src kinaze (Kohm i Sanders, 2001). Smatra se da je β_2 -adrenergički receptor od primarnog značaja u regulaciji funkcija imunskog sistema (Madden, 2003). U prilog tome govori činjenica da su β_2 -adrenergički receptori ispoljeni na praktično svim tipovima ćelija imunskog sistema, za razliku od β_1 - i β_3 -adrenergičkih receptora (Sanders i sar., 1997; Elenkov i sar., 2000; Kohm i Sanders, 2001). Osim toga, smatra se da u fiziološkim uslovima mononuklearne ćelije periferne

krvi, uglavnom, ne ispoljavaju α -adrenergičke receptore (Casale i Kaliner, 1984), iako izvesne funkcijske studije sugerišu ulogu α -adrenergičkih receptora u modulaciji imunskih funkcija (Singh, 1979; Spengler i sar., 1990; Maestroni i Conti, 1994a, b). Pretpostavlja se da se α -adrenergički receptor ispoljava u određenim patološkim stanjima ili u specifičnim ćelijskim odeljcima imunskog sistema, u određenim fazama sazrevanja ćelija imunskog sistema ili u aktivisanim ćelijama (Elenkov i sar., 2000; Kavelaars, 2002).

Autoradiografskom analizom vezivanja [125 I]-jodocijanopindolola, u prisustvu rastućih koncentracija selektivnih agonista i antagonista β_1 - i β_2 -adrenergičkih receptora, utvrđeno je da se u timusu pacova dominantno ispoljava β_2 -adrenergički receptor, pre svega, u medularnom odeljku (Marchetti i sar., 1990a, b). Ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora je kasnije pokazano i na nivou ekspresije odgovarajućeg gena (Marchetti i sar., 1994). Na osnovu dozno-zavisnog povećanja aktivnosti AC i akumulacije cAMP-a, u odgovoru na primenu različitih agonista β_2 -adrenergičkog receptora, što je moguće sprečiti alprenololom, antagonistom β -adrenergičkih receptora, utvrđeno je da je β_2 -adrenergički receptor u timusu funkcionalno aktivan (Marchetti i sar., 1994).

Podaci o ispoljavanju β -adrenergičkih receptora na pojedinim tipovima ćelija timusa su oskudni. Primenom L-[propil-2,3- 3 H] dihidroalprenolola, antagonista β -adrenergičkih receptora, pokazano je da timociti miša i pacova ispoljavaju ovaj tip receptora (Singh i sar., 1979; Fuchs i sar., 1988, Kubera i sar., 1992). Osim toga, uočeno je da površinska gustina β -adrenergičkih receptora raste tokom procesa sazrevanja timocita, i da tek zrele ćelije u meduli pokazuju gustinu ovog receptora koja može da se poredi sa onom na membrani zrelih T-ćelija slezine (Fuchs i sar., 1988). Primenom [125 I]-jodohidroksibenzil pindolola nađeno je prisustvo β_2 -adrenergičkog receptora na membrani mišjih timocita (Loveland i sar. 1981). TEC pacova gajene u kulturi eksprimiraju iRNK za β -adrenergičke receptore, kao i funkcijski aktivne receptorske proteine na membrani (Kurz i sar., 1997). Kako je poznato da MF (Kiyoteru, 1977; Tan i sar., 2007), monociti i DC (Panina-Bordignon, 1997), kao i mastociti (Tomita i sar., 1974; Donlon i sar., 1982) ispoljavaju β -adrenergički receptor, slično bi se moglo očekivati i kada su u pitanju ove ćelije u timusu, ali konkretnih dokaza još uvek nema.

1.2.5. β -adrenergički receptori i timopoeza

Podaci o prisustvu simpatičke inervacije u timusu u kritičnom periodu postnatalnog razvoja glodara ukazuju na ulogu noradrenalina u razvoju ovog organa (Marchetti i sar., 1990b; Elenkov i sar., 2000). Prisustvo simpatičkih nervnih vlakana u timusu pacova pokazano je još u kasnom embrionalnom periodu (Leposavić i sar., 2008a), distribucija karakteristična za adultni uzrast je uočena 14. postnatalnog dana (Bellinger i sar., 1992), a gustina vlakana koja odlikuje adultni timus sa dostizanjem puberteta (Singh, 1984; Marchetti i sar., 1990b; Leposavić i sar., 1992). Kod mužjaka glodara, počevši od puberteta, gustina noradrenergičkih nervnih vlakana (Madden i sar., 1997; Bellinger i sar., 2001) i sledstveno koncentracija noradrenalina (Madden i sar., 1997; Cavallotti i sar., 1999; Bellinger i sar., 2001) rastu u ovom organu. Porast koncentracije noradrenalina u timusu, uz podatke koji ukazuju da kateholamini generalno deluju inhibitorno na sazrevanje T-limfocita (Singh i Owen, 1976; Rauški i sar., 2003a, b; Leposavić i sar., 2006), ukazala je na moguću ulogu simpatičkog nervnog sistema i noradrenalina u involuciji timusa i, sledstveno, u deregulaciji funkcija imunskog sistema tokom starenja (Madden i sar., 1997).

Uvid u ulogu simpatičke inervacije u regulaciji timopoeze dale su denervacione studije, kao i niz *in vitro* i *in vivo* istraživanja. Generalno, ova ispitivanja su ukazala na inhibitorno delovanje kateholamina na diferencijaciju i sazrevanje timocita. Nađeno je da kod atimičnih miševa (engl. nude mice) hirurška simpatektomija indukuje timopoezu (Singh, 1985a, b). Izoproterenol, agonist β -adrenergičkih receptora, smanjuje proliferaciju, istovremeno stimulišući ispoljavanje antigena diferencijacije na membrani timocita miša *in vitro*, (Singh i Owen, 1976). Kod pacova, hemijska simpatektomija 6-hidroksidopaminom (Kendall i Al-Shavaf, 1991), kao i blokada β -adrenergičkih receptora (Rauški i sar., 2003a, b) dovodi do povećanja procenta proliferišućih timocita i timocita u apoptozi. Konačno, i kod pacova i kod miša, primena antagonista β -adrenergičkih receptora izaziva promenu relativnih zastupljenosti pojedinih subpopulacija timocita, definisanih na osnovu ispoljavanja CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$ molekula, potvrđujući ulogu kateholamina u sazrevanju ovih ćelija u timusu (Madden i Felten, 2001; Rauški i sar., 2003a, b).

Modulatorno delovanje kateholamina u timusu se najverovatnije ostvaruje na dva nivoa: direktnim delovanjem na T-ćelije u razvoju i indirektno, modulacijom aktivnosti

ćelija strome timusa. Kako su TEC glavni izvor citokina u timusu (Yarilin i Belyakov, 2004), kao i timusnih peptidnih hormona, te klasičnih neuropeptida/peptidnih hormona (Savino i Dardenne, 2000), moguće je očekivati da kateholamini ostvaruju modulatorno dejstvo u timusu oblikujući sekretorni profil TEC. Budući da je pokazano da histamin utiče na ispoljavanje antigena diferencijacije na timocitima *in vitro* (Singh i Owen, 1976), kateholamini bi mogli uticati na timopoezu i delovanjem na mastocite (Kaliner i sar., 1972; Tomita i sar., 1974). Konačno, ni uticaj kateholamina na timopoezu posredstvom β -adrenergičkih receptora MF i DC se ne može isključiti.

1.3. UTICAJ MUŠKIH POLNIH HORMONA NA FUNKCIJU TIMUSA

1.3.1. Interakcije polnih hormona i imunskog sistema

Uz glukokortikoide i kateholamine, i polni hormoni imaju važnu ulogu u regulaciji funkcije imunskog sistema (Tanriverdi i sar., 2003). Generalno, estrogeni se smatraju stimulatorima imunskog odgovora, dok se androgeni smatraju prirodnim imunosupresorima (Cutolo i sar., 2002). Eksperimentalno je pokazano da ženke miša, u odnosu na mužjake, proizvode veću količinu antitela u odgovoru na čitav niz antigena (Ansar Ahmed i Talal, 1990) i da pokazuju efikasniji antitumorski imunski odgovor i odbacivanje kalema pri presađivanju (Ansar Ahmed i Talal, 1990; Graff i sar., 1969). Uočen je i polni dimorfizam u učestalosti autoimunskih bolesti, koji se ogleda u češćem oboljevanju i težoj kliničkoj slici kod jedinki ženskog pola (Olsen i Kovacs, 1996). U mišjem modelu sistemskog eritemskog lupusa (NZB/NZW F1 soj miševa) je pokazano da ženke i kastrirani mužjaci spontano razvijaju bolest i umiru ranije od intaktnih mužjaka. Davanjem 5 α -dihidrotestosterona, koji se ne može konvertovati u estrogen aromatizacijom, smanjuje se nivo autoreaktivnih antitela i produžava životni vek, dok davanje estrogena *in vivo* ubrzava tok bolesti i dovodi do smrti (Roubinian i sar., 1977a; Siiteri i sar., 1980). U ovom modelu je pokazano i da uklanjanje jajnika ne utiče na tok bolesti, dok primena androgena kod kastriranih ženki sprečava pojavu bolesti (Roubinian i sar., 1977a), potvrđujući aktivnu imunoregulatornu ulogu androgena. Slični podaci su dobijeni i u mišjem modelu dijabetesa tipa 1 (engl. nonobese diabetic, NOD soj) (Ansar Ahmed i Talal, 1990), kao i u pacovskim modelima autoimunskih bolesti, poput poliartritisa kod LEW/N pacova i autoimunskog tiroiditisa kod PVG/c životinja (Yagi i sar., 1991). Konačno, i kod ljudi se autoimunske bolesti češće javljaju

kod žena nego kod muškaraca (Bijlsma i sar., 2002), što se povezuje sa koncentracijom polnih steroida u cirkulaciji (Olsen i Kovacs, 1996).

1.3.2. Ekspresija receptora za androgene u ćelijama timusa

Odgovor ćelija na prisustvo androgena je posredovan odgovarajućim klasičnim citoplazmatskim receptorima (Beato i Sanchez-Pacheco, 1996), koji po vezivanju liganda, u dimernom obliku, prelaze u jedro, i kao transkripcioni faktori direktno regulišu ekspresiju gena koji u promotorskom regionu sadrže odgovarajuće vezujuće mesto (Beato i Klug, 2000). S obzirom na odsustvo klasičnog receptora za androgene, smatra se da androgeni ne utiču direktno na funkciju zrelih T-ćelija (Cohen i sar., 1983; Rife i sar., 1990). Međutim, klasičan citoplazmatski receptor za androgene je nađen u TEC miša (Olsen i sar., 2001) i pacova (Kumar i sar., 1995), kao i u timocitima obe vrste (Kumar i sar., 1995; Viselli i sar., 1995a; Radojević i sar., 2011). Kod miša najviši nivo ekspresije pokazuju najnezreliji timociti (Viselli i sar., 1995a). Podaci koji pokazuju da uklanjanje timusa onemogućava zaštitno delovanje androgena na razvoj sistemskog eritemskog lupusa kod NZB/W miševa (Roubinian i sar., 1977b), ukazuju da timus predstavlja ključno mesto delovanja androgena na imunski sistem.

1.3.3. Uticaj muških polnih hormona na timus

Poznato je da su kod mužjaka miša masa timusa, ukupan broj ćelija i odnosi između pojedinih subpopulacija timocita izuzetno osetljivi na promene nivoa androgena (Olsen i sar., 2001). Naime, orhidektomija u adultnom uzrastu kod miša (Olsen i sar., 1991a) i pacova (Greenstein i sar., 1986) dovodi do povećanja mase timusa, što se može suprimirati davanjem androgena (Greenstein i sar., 1986; Olsen i sar., 1991a). Hiperplazija timusa je uočena i kod miševa sa testikularnom feminizacijom (Tfm soj), koji usled mutacije receptora za androgene ne mogu odgovoriti na prisustvo ovih hormona (Olsen i Kovacs, 1989). Sa druge strane, pokazano je da davanje androgena eksperimentalnim glodarima izaziva atrofiju timusa (Olsen i sar., 1998; Dulos i Bagchus, 2001; Oner i Ozan, 2002), nalik onoj koja se javlja u starenju. Na prethodno navedenim podacima je zasnovano široko prihvaćeno mišljenje da izražen porast koncentracije polnih hormona, koji se javlja u pubertetu, predstavlja ključan faktor u započinjanju/razvoju involucije timusa. Zaista, pokazalo se da orhidektomija u

prepubertetnom uzrastu sprečava involuciju timusa, kao i progresivno smanjenje efikasnosti timopoeze i adaptivnog imunskog odgovora u adultnom uzrastu (Leposavić i Perišić, 2008).

Pokazano je da su promene u masi timusa, koje nastaju usled promena u delovanju muških polnih hormona, posledica promena u ukupnom broju timocita (Ansar Ahmed i sar., 1985; Dulos i Bagchus, 2001; Roden i sar., 2004). Promene u broju timocita su direktno povezane sa promenama u proliferaciji, apoptozi i migraciji ovih ćelija (Olsen i Kovacs, 1996). U prilog ovoj tvrdnji idu podaci da orhidektomija povećava procenat timocita u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (Olsen i sar., 1994), kao i osetljivost timocita pacova (Windmill i Lee, 1999) i miša (Olsen i sar., 1991a) na proliferativno delovanje konkanavalina A u kulturi. Sa druge strane, testosteron indukuje apoptozu DP timocita miša, povećavajući produkciju TNF- α i osetljivost timocita na delovanje ovog citokina (Guevara Patiño i sar., 2000). Međutim, postoje i podaci koji ukazuju da i efikasnije naseljavanje timusa prekursorima iz kostne srži može uticati na povećanje broja timocita kod orhidektomisanih miševa (Heng i sar., 2005).

Postoji čitav niz eksperimentalnih podataka koji ukazuju da androgeni modulišu i proces diferencijacije/sazrevanja timocita. Naime, orhidektomija kod miša „pomera“ odnos zastupljenosti subpopulacija timocita, tako da što povećava procentualno učešće nezrelijih subpopulacija timocita, a smanjuje procenat zrelijih CD4-CD8+ JP i CD3+ subpopulacija ćelija (Olsen i sar., 1991a). Sa druge strane, davanje testosterona orhidektomisanim životinjama ponovo uspostavlja ravnotežu, povećavajući zastupljenost timocita zrelijeg fenotipa (Olsen i sar., 1991a; Dulos i Bagchus., 2001).

1.3.4. Muški polni hormoni i kateholamini

Iako podaci o interakcijama kateholamina i androgena nisu brojni, postojanje polnog dimorfizma u monoaminergičkom sistemu centralnog nervnog sistema (Breedlove, 1992; Kawata, 1995) sugerisalo je postojanje funkcionalne međuzavisnosti steroidnih hormona i monoaminergičkih sistema (Biegon, 1990; Becker, 1992). U različitim životinjskim modelima, pokazalo se da polni hormoni, pre svega androgeni, imaju ključnu ulogu u uspostavljanju polnog dimorfizma, kroz maskulinizaciju mozga (Cooke i sar., 1998). Pored delovanja androgena u perinatalnom razvojnem periodu, danas se zna da je prisustvo ovih hormona nužno i u odraslom dobu, za potpunu

strukturnu, hemijsku i funkcijsku maskulinizaciju mozga (Kawata, 1995; Cooke i sar., 1998). Mehanizmi delovanja androgena na uspostavljanje polnog dimorfizma uključuju efekte na apoptozu i migraciju neurona, rast tela neurona i dendrita, kao i uspostavljanje, odnosno prekidanje sinapsi (Cooke i sar., 1998). Pokazalo se da su i neuroni autonomnog nervnog sistema, preganglijski (Watkins i Keast, 1999) i postganglijski (Keast, 2000), podložni uticaju androgena, i to neposrednom, putem receptora za androgene, i posrednom, putem receptora za estrogene, nakon konverzije androgena u estrogene delovanjem aromataze (Keast, 2000).

Pored uticaja na veličinu i morfologiju neurona, već rane studije su, metodom formaldehidom indukovane tkivne fluorescence, pokazale da orhidektomija dovodi i do smanjenja sadržaja kateholamina u ganglionima autonomnog nervnog sistema (Partanen i Hervonen, 1979). Naknadno je utvrđeno da orhidektomija kod odraslih pacova dovodi do smanjenja aktivnosti TH u ganglionima autonomnog nervnog sistema, dok se aktivnost enzima povećava usled tretmana testosteronom (Hamill i sar., 1984; Melvin i Hamill, 1986). Slični efekti orhidektomije i tretmana testosteronom na aktivnost TH, ali i dihidroksi-fenilalanin-dekarboksilaze (enzim koji katalizuje sintezu dopamina iz L-dihidroksi-fenilalanina, L-DOPA), koji se vezuju za promene aktivnosti enzima po ćeliji, a ne za promene u broju neurona, su pokazani i u pelvičnom ganglionu pacova (Melvin i Hamill, 1987; Melvin i sar., 1988; Melvin i Hamill, 1989). Novija istraživanja pokazuju da je smanjenje aktivnosti TH u hipogastričnom ganglionu, usled nedostatka androgena izazvanog kastracijom, praćeno smanjenjem koncentracije noradrenalina (Hamill i Schroeder, 1990), kao i da su ovi efekti vezani za smanjenje ekspresije gena za TH i njegovog proteinskog produkta (Goldstein i sar., 1992).

Posebno je važno napomenuti da polni hormoni utiču i na simpatičku inervaciju timusa pacova. Kod ženki pacova je pokazano da tokom trudnoće i postpartalnog perioda dolazi do promena u broju simpatičkih nervnih vlakana u timusu, kao i u sadržaju noradrenalina (Kendall i sar., 1994). Kada je u pitanju efekat androgena na simpatičku inervaciju timusa, preliminarna istraživanja su pokazala da kastracija mužjaka pacova prvog, sedmog i tridesetog postnatalnog dana dovodi do smanjenja koncentracije noradrenalina i gustine simpatičkih nervnih vlakana u timusu adultnih životinja, što ukazuje na značaj hormona testisa za razvoj simpatičke inervacije timusa (Leposavić i sar., 2000a).

Iz navedenih podataka proizilazi nekoliko pitanja. Prvo, da li orhidektomija u prepubertetnom uzrastu, uz promenu gustine nervnih vlakana, utiče i na sadržaj noradrenalina u njima. Drugo, imajući u vidu prethodno navedene podatke o sintezi kateholamina u zrelih limfocitima, odnosno MF, DC i različitim tipovima epitelnih ćelija (Musso i sar., 1996; Elwan i Sakuragawa, 1997; Qiu i sar., 2005; Flierl i sar., 2007; Nakano i sar., 2009; Al-Wadei i sar., 2012), da li su promene u koncentraciji noradrenalina u timusu prepubertetno orhidektomisanih adultnih pacova vezane isključivo za simpatička nervna vlakna, ili im doprinose i drugi izvori kateholamina. Treće, postavlja se pitanje da li promene u koncentraciji noradrenalina u timusu prepubertetno orhidektomisanih adultnih pacova utiču na proces sazrevanja/diferencijacije timocita kod ovih životinja.

1.3.5. Muški polni hormoni i β -adrenergički receptori

Danas se zna da, pored efekata na presinaptičkom nivou, važan mehanizam kojim polni hormoni modulišu osetljivost tkiva na delovanje kateholamina predstavlja i regulacija ispoljavanja adrenergičkih receptora, uključujući i β -adrenergičke receptore (Sulser i sar., 1983; Stiles i sar., 1984). Pokazano je da davanje testosterona *in vivo* ushodno reguliše ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u bubrezima, prostati i masnom tkivu (Collins i sar., 1991; Xu i sar., 1991). U izvesnim slučajevima, testosteron moduliše delovanje kateholamina isključivo postsinaptičkim mehanizmima, utičući, prevashodno, na ispoljavanje adrenergičkih receptora (Keast, 2000). Kada je u pitanju timus, pokazano je da postoji polni dimorfizam u ispoljavanju β_2 -adrenergičkog receptora u ovom organu (Marchetti i sar., 1990b; Leposavić i sar., 2011), kao i da se ispoljavanje ovog receptora menja tokom postnatalnog razvoja (Marchetti i sar., 1990b). Osim toga, pokazano je da nivo ispoljavanja ovog receptora kod odraslih životinja zavisi od koncentracije ženskih polnih hormona u cirkulaciji (Marchetti i sar., 1994). Međutim, direktna veza između nivoa muških polnih hormona u cirkulaciji i ispoljavanja β -adrenergičkih receptora u timusu do sada nije pokazana. Shodno tome, ni mogući uticaj polnih hormona na timopoezu modulacijom delovanja kateholamina na ovaj proces, posredstvom β -adrenergičkih receptora, još uvek nije ispitan.

Konačno, imajući u vidu da započinjanje involutivnih promena u timusu glodara koincidira ne samo sa promenama u koncentraciji polnih steroidnih hormona, već i sa

promenama u koncentraciji noradrenalina u ovom organu (Bellinger i sar., 1988; Madden i sar., 1997), kao i podatke koji ukazuju da polni steroidni hormoni utiču na sintezu kateholamina i ekspresiju β -adrenergičkih receptora u mnogim tipovima ćelija (Collins i sar., 1988; Shima, 1992), nametnulo se pitanje da li steroidni hormoni testisa utiču na efikasnost timopoeze i tako što deluju na sintezu kateholamina i/ili ispoljavanje β -adrenergičkih receptora u timusu.

2. CILJEVI

Imajući u vidu sve izneto u prethodnom poglavlju, cilj ove doktorske disertacije je bio:

- 1) identifikovanje mogućih ćelijskih izvora kateholamina u timusu, kao i ćelija koje ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor;
- 2) ispitivanje značaja prisusva fizioloških koncentracija muških polnih hormona tokom ontogeneze, za postizanje fizioloških koncentracija kateholamina i nivoa ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora u timusu odraslih životinja, i, sledstveno, za modulatorno delovanje kateholamina na diferencijaciju/sazrevanje timocita u timusu odraslih životinja.

Da bi se zadati ciljevi ostvarili, postavljeni su sledeći eksperimentalni zadaci:

- 1) da se utvrdi da li timociti i različiti tipovi ćelija strome timusa sadrže i/ili sintetišu kateholamine i ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor;
- 2) da se ispita da li orhidektomija u kasnom prepubertetnom periodu, u kojem je timus pacova strukturno i funkcijski najosetljiviji na uklanjanje muških polnih hormona (Windmill i sar., 1993), utiče na:
 - a) koncentraciju kateholamina u timusu odraslih životinja, i ako je odgovor potvrđan, da se utvrdi da li su za to odgovorne promene u simpatičkoj inervaciji i/ili promene na nivou ćelija timusa koje sintetišu kateholamine;
 - b) ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora na timocitima i ćelijama strome timusa odraslih životinja;
 - c) modulatorno delovanje kateholamina posredstvom β -adrenergičkih receptora na diferencijaciju/sazrevanje T-ćelija u timusu odraslih životinja.

Da bi se ispitaio uticaj kateholamina na diferencijaciju/sazrevanje T-ćelija u timusu posredstvom β -adrenergičkih receptora analiziran je uticaj četrnaestodnevog tretmana propranololom, antagonistom β -adrenergičkih receptora, na: i) ukupan broj timocita, ii) proliferaciju i apoptozu timocita, iii) ispoljavanje antigena diferencijacije timocita i iv) zastupljenost glavnih populacija svežih timusnih emigranata i T-ćelija u perifernoj krvi kod orhidektomisanih i neorhidektomisanih pacova.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U eksperimentalnom radu su korišćeni mužjaci pacova AO (engl. Albino Oxford) srodničkog (engl. inbred) soja, odgajani u štali Centra za imunološka istraživanja „Branislav Janković“, Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu. Po tri eksperimentalne životinje su bile smeštene u providne polietilenske kaveze sa sterilnom piljevinom i gajene u standardnim laboratorijskim uslovima. Životinjama je obezbeđena konstantna temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), relativna vlažnost vazduha (50% - 60%), režim smenjivanja svetla i mraka u intervalima od 12 sati i slobodan pristup hrani i vodi (*ad libitum*).

Životinje su gajene i sve eksperimentalne procedure su izvedene u skladu sa Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“.

3.2. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

Istraživanja prikazana u ovom radu su obuhvatila dve velike grupe eksperimenata.

U prvoj grupi eksperimenata, mužjaci pacova, starosti od 30 dana, su podvrgnuti bilateralnoj hirurškoj orhidektomiji (ORH životinje) ili lažnoj (engl. sham) orhidektomiji (kontrolne životinje). Ove životinje (12 po grupi) su žrtvovane 75. dana života. Životinje su podvrgnute bilateralnoj orhidektomiji u uzrastu od 30 dana, na osnovu podataka koji ukazuju da se najizraženije promene u masi timusa i broju timocita kod odraslih životinja dobijaju kada se testisi uklone u uzrastu između četvrte i pete nedelje života (Windmill i sar., 1993).

U drugoj grupi eksperimenata, mužjaci pacova su, u uzrastu od 30 dana, podvrgnuti bilateralnoj hirurškoj orhidektomiji (ukupno 24) ili lažnoj orhidektomiji (ukupno 24), da bi, počevši od 61. dana života, po 12 ORH i kontrolnih životinja bilo podvrgnuto tretmanu propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR), u trajanju od 14 dana.

Iz svake eksperimentalne grupe, i u prvoj i u drugoj grupi eksperimenata, odabrano je po 6 životinja koje su žrtvovane dekapitacijom. Ovim životinjama su

pažljivo vađeni timusi, čišćeni od okolnog masnog, vezivnog i paratimusnog limfoidnog tkiva, a zatim je:

1) ispitivana ekspresija TH u timocitima primenom protočne citofluorimetrije i imunocitohemijske metode, kao i ekspresija TH u stromalnom odeljku timusa, primenom imunocitohemijskog bojenja preseka tkiva timusa i izolovanih ćelija strome timusa;

2) u tkivu timusa i timocitima, meren sadržaj noradrenalina metodom reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (engl. reverse-phase high pressure liquid chromatography, RP-HPLC), i ekspresija gena za TH, DBH i monoamino-oksidadzu A (MAO-A), primenom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR);

3) ispitivana gustina noradrenergičkih nervnih vlakana i ćelija strome koje sadrže kateholamine u timusu saharoza-fosfat-glioksalna kiselina (SPG) metodom i meren sadržaj kateholamina u njima, na osnovu kvantifikacije intenziteta emitovanog fluorescentnog signala; i

4) merena ekspresija gena za β_2 -adrenergički receptor u tkivu timusa i timocitima primenom qRT-PCR metode i ispitivano ispoljavanje receptorskog proteina u timocitima, upotrebom protočne citofluorimetrije, kao i ćelijama strome timusa, upotrebom imunocitohemijskog bojenja preseka tkiva timusa.

U okviru obe grupe eksperimenata, po 6 životinja iz svake eksperimentalne grupe je korišćeno za ispitivanje procesa diferencijacije/sazrevanja timocita i fenotipskog profila T-limfocita periferne krvi. Ove životinje su, nakon vađenja periferne krvi punkcijom iz srca u opštoj anesteziji, žrtvovane postepenim povećanjem koncentracije CO₂. Životinje su anestezirane intraperitonealnim davanjem pentobarbiton natrijuma (Sagatal, Rhône Mérieux, Ltd., Harlow, UK; 60 mg/kg telesne mase).

Nakon žrtvovanja, timusi su pažljivo vađeni, čišćeni od okolnog masnog, vezivnog i paratimusnog limfoidnog tkiva i upotrebljeni za dobijanje suspenzija timocita, u kojima je, upotrebom protočne citofluorimetrije:

- 1) merena procentualna zastupljenost proliferišućih timocita i timocita u apoptozi; i
- 2) ispitivano ispoljavanje markera diferencijacije/sazrevanja timocita, kao i markera regulatornih ćelija

U suspenzijama ćelija sveže izolovanih iz periferne krvi, protočno citofluorimetrijskom metodom, određivana je:

- 1) zastupljenost svežih timusnih emigranata;
- 2) zastupljenost glavnih populacija T-limfocita; i
- 3) zastupljenost ćelija Treg i NKT regulatornog fenotipa

3.3. EKSPERIMENTALNE PROCEDURE

3.3.1. Bilateralna orhidektomija

Hirurško uklanjanje testisa izvršeno je u opštoj anesteziji (Sagatal, 60mg/kg telesne mase). Pravljenjem malog reza na skrotumu, testisi su eksponirani i, nakon čvrstog podvezivanja testisne peteljke, uklanjani njenim presecanjem. Lažna operacija je izvedena na isti način, pravljenjem reza na skrotumu, rasecanjem masnog tkiva u neposrednoj blizini tesisa, ali bez njihovog uklanjanja. Nakon zatvaranja rane sterilnim hirurškim koncem, svaka životinja se oporavljala od intervencije u posebnom kavezu. Za ublažavanje postoperativnog bola korišćen je brufen, *per os* (Galenika a.d., Beograd, Srbija, 15 mg/kg telesne mase).

3.3.2. Tretman propranololom

Tokom 14 uzastopnih dana, orhidektomisanim i lažno orhidektomisanim pacovima supkutano je ubrizgavan rastvor propranolol hidrohlorida u fiziološkom rastvoru, u dozi od 0.4 mg/100 µl fiziološkog rastvora/100 g telesne mase/dan. Odgovarajuće kontrolne grupe sačinjavali su orhidektomisani i lažno orhidektomisani pacovi kojima je, tokom istog vremenskog perioda, ubrizgavan sterilan fiziološki rastvor (100 µl/100 g telesne mase/dan). Protokol tretmana propranololom je osmišljen na osnovu podataka da: 1) supkutano davanje propranolola obezbeđuje 5-6 puta veću bioraspoloživost, u odnosu na oralnu primenu (Rao i sar., 2003), i 2) opisani tretman propranololom kod pacova soja Wistar dovodi do promene u strukturi timusa i timopoezi (Plećaš-Solarović i sar., 2004; Lepasavić i sar., 2006).

3.4. HEMIKALIJE, ANTITELA I IMUNOKONJUGATI

Propranolol hidrohlorid, natrijum azid (NaN_3), Tween 20, paraformaldehid i vitalna boja tripan plavo su nabavljeni od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Nemačka). 7-amino-aktinomycin D (7-AAD) je nabavljen od BD Biosciences Pharmingen (Mountain View, CA, SAD). Goveđi serum albumin je nabavljen od Fluka AG Chemie GmbH (Buchs SG, Švajcarska). Za pripremu kompletnog RPMI-1640 medijuma (Sigma-Aldrich) korišćene su sledeće hemikalije: 25 mM N-2-hidroksietilpiperazin N'-2-etansulfonska kiselina HEPES (Sigma-Aldrich), 1 mM natrijum piruvat (Serva, Heidelberg, Nemačka), 100 jedinica/ml penicilin (ICN, Costa Mesa, CA, SAD), 100 mg/ml streptomycin (ICN) i 5% inaktivisani fetalni teleći serum (Gibco, Grand Island, NY, SAD).

Za obeležavanje membranskih i unutarćelijskih antigena korišćena su sledeća monoklonska antitela: fikoeritrin (PE)-konjugovano anti-CD45RC (klon OX-22), FITC/PE-konjugovano anti-CD4 (klon OX-38), FITC/PE/biotin-konjugovano anti-CD8 (klon OX-8), FITC-konjugovano anti-CD2 (reaktivno sa LFA-2 anigenom, klon OX-34), peridinin hlorofil protein (PerCP)-konjugovano/nekonjugovano anti-TCR $\alpha\beta$ (klon R73), PE/PerCP-konjugovano anti-CD90 (Thy-1.1, klon OX-7), FITC-konjugovano anti-CD161a (klon 10/78), biotin-konjugovano anti-CD25 (klon OX-39), PE-konjugovano anti-CD3 (klon G4.18), nekonjugovano anti-TH (klon TOH A1) i nekonjugovano anti-CD68 (klon ED1). Navedena monoklonska antitela su nabavljena od BD Biosciences Pharmingen. Streptavidin-PerCP, FITC-konjugovani koza anti-miš i koza anti-kunić IgG, i izotipske IgG kontrole su nabavljeni, takođe, od BD Biosciences Pharmingen.

Nekonjugovana monoklonska anti-CD103 (klon OX-62) i anti-MHC II (klon OX-6) antitela su kupljena od firme Serotec (Oxford, Velika Britanija), dok je nekonjugovano monoklonsko anti-pan citokeratin (klon PCK-26) antitelo nabavljeno od Sigma-Aldrich. Poliklonska kunić anti- β_2 -adrenergički receptor (H-73) i koza anti-CD69 (P-17) antitela su nabavljena od Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, SAD).

Fiksativ bez formalina, IHC zinc fixative, je kupljen od BD Biosciences Pharmingen.

U procedurama vezanim za kvantifikaciju ekspresije gena upotrebljeni su sledeći komercijalni TaqMan eseji za merenje ekspresije iRNK pacova: TH (Rn00562500_m1), DBH (Rn00565819_m1), MAO-A (Rn01430950_m1), β_2 -adrenergički receptor (Rn00560650_s1) i β -aktin (Rn00667869_m1).

Za indukciju tkivne fluorescence korišćeni su: glioksalna kiselina, saharoza i glicin (Sigma-Aldrich Chemie).

Za određivanje koncentracije kateholamina korišćene su sledeće hemikalije: metanol (CH₃OH) (Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, Švajcarska); perhlorna kiselina (HClO₄) i natrijum tiosulfat (Na₂S₂O₅) (Merck, Darmstadt, Nemačka); kalijum dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), dinatrijumova so etilendiamin-tetrasirćetne kiseline (Na₂-EDTA), heptansulfonska kiselina (Sigma-Aldrich Chemie) i standardi: noradrenalin (L-noradrenalin hidrohlorid, Sigma-Aldrich Chemie), adrenalin ((±) adrenalin hidrohlorid (Sigma-Aldrich Chemie)) i 3,4-dihidroksibenzilamin (DHBA) (Aldrich, Steinheim, Nemačka).

U procedurama izolacije ćelija strome timusa korišćeni su tripsin i DNKza I, proizvođača Serva (Heidelberg, Nemačka), i OptiPrepTM gradijent (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norveška).

3.5. IZOLOVANJE ĆELIJA TIMUSA I PERIFERNE KRVI

3.5.1. Timociti i limfociti periferne krvi

Tkivo izolovanih timusa je usitnjavano i protiskivano kroz sterilnu mrežicu veličine pora od 60 μ m, a oslobođeni timociti su spirani hladnim fosfatnim puferom (PBS, engl. phosphate buffered saline) (pH=7.4), kojem je dodat 2% fetalni teleći serum (FCS) i 0.09% NaN₃ (FACS pufer, engl. Fluorescence Activated Cell Sorting).

U perifernoj krvi, izvađenoj u prisustvu heparina kao antikoagulansa, eritrociti su lizirani rastvorom amonijum hlorida. Nakon liziranja eritrocita, limfociti krvi su taloženi centrifugiranjem na 300 x g, 10 minuta, a talog je resuspendovan u hladnom FACS puferu.

Na opisani način dobijene suspenzije su oprane tri puta u ledeno hladnom FACS puferu, centrifugiranjem na 300 x g, 5 minuta. Broj ćelija u suspenzijama je utvrđen primenom usavršenog Neubauer-ovog hemocitometra, korišćenjem vitalne boje tripan

plavo, koja obeležava isključivo mrtve ćelije. Preživljavanje ćelija u suspenzijama je bilo uvek veće od 95%. Gustina ćelija u suspenzijama je podešena na 1×10^7 ćelija/ml.

3.5.2. Timusne epitelne ćelije

Ćelije strome timusa su izolovane po modifikovanoj proceduri Wekerle i sar. (1980). Timusi su usitnjavani do uklanjanja većih komada tkiva, i dobijeni homogenat je prenet u bocu za tripsinizaciju i mućkan u 50 ml hladnog PBS, 5 minuta. Supernatant, u kojem sa nalazila većina timocita koje je bilo moguće mehanički ukloniti, je odliven, a istaložena frakcija ćelija je resuspendovana u 50 ml zagrejanog rastvora tripsina i DNKze u PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} , i mućkana 10 minuta da bi se uklonili preostali timociti. Timusni fragmenti su podvrgnuti daljim ciklusima enzimske razgradnje (3-4 puta), primenom tripsina i DNKze, u trajanju od 20 minuta, na 37°C . Nakon svakog ciklusa, sakupljani su supernatanti izdvojenih ćelija, a preostale sedimentirane ćelije su podvrgavane daljoj enzimskoj razgradnji. Nakon poslednje digestije, talog je resuspendovan u RPMI-1640 i ćelije su propuštene kroz mrežicu, veličine pora od 100 μm . Dobijene ćelijske suspenzije su pažljivo naslojene na 10 ml inaktivisanog FTS, u konusnim staklenim epruvetama za centrifugiranje od 40 ml. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, talog je sakupljen, resuspendovan u RPMI-1640 medijumu, naslojen na 5 ml FTS u plastičnoj Falcon epruveti od 12 ml i ostavljen da se taloži narednih 10 minuta. Dobijena ćelijska populacija se sastojala od timusnih ćelija “dadilja” i TEC koje obrazuju rozete sa timocitima.

3.5.3. Timusne dendritske ćelije

Suspenzije timocita napravljene u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 5% FTS i 0.04% Na_2EDTA , su poslužile kao polazište za dobijanje populacije obogaćene timusnim DC. Ćelije su izdvojene po proceduri koju su opisali Vasilijić i saradnici (2003). Naime, DC su dobijene centrifugiranjem suspenzija na $600 \times g$, 15 minuta, na 4°C , korišćenjem OptiPrepTM gradijenta, prema preporuci proizvođača. Čistoća populacije dobijenih DC je bila 40-50%, što je utvrđeno morfološki i imunocitohemijskim bojenjem. Kontaminirajuće ćelije su uglavnom činili timociti i MF.

3.6. KLONIRANE ĆELIJSKE LINIJE

U ovoj studiji su korišćene tri klonirane ćelijske linije. Ćelije R-TNC 1 linije ispoljavaju ultrastrukturne i fenotipske karakteristike cTEC tipa 2 ili tipa 3 (Čolić i sar., 1994), dok ćelije TE-R 2.5 linije ispoljavaju karakteristike mTEC tipa 6 (Čolić i sar., 1992). Tehnikom imunocitohemijskog bojenja, ispitivana je ekspresija TH u navedenim ćelijskim linijama. Pored toga, kao pozitivna kontrola imunocitohemijskog obeležavanja TH, upotrebljena je PC 12 linija adrenalnog feohromocitoma (ATCC, Rockville, MD, SAD), koja ispoljava enzime uključene u biosintezu kateholamina, uključujući i TH.

3.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KATEHOLAMINA METODOM REVERZNO-FAZNE TEČNE HROMATOGRAFIJE POD VISOKIM PRITISKOM

3.7.1. Priprema uzoraka timusnog tkiva i timocita za određivanje koncentracije kateholamina

Za određivanje koncentracije kateholamina u tkivu timusa, deo organa, neposredno po izolovanju, je zamrzavan na -70°C i čuvan do analize. Za određivanje koncentracije kateholamina u timocitima, deo sveže izolovanog timusa je usitnjavao i protiskivan kroz sterilnu mrežicu veličine pora od $60\ \mu\text{m}$, a oslobođeni timociti su spirani hladnim PBS. Timociti u suspenzijama su dva puta oprani u ledeno hladnom PBS, centrifugiranjem na $300\ \text{x g}$, a zatim je broj ćelija u suspenzijama utvrđen primenom usavršenog Neubauer-ovog hemocitometra, korišćenjem vitalne boje tripan plavo, koja obeležava isključivo mrtve ćelije. Iz suspenzija je izdvajana zapremina koja je sadržala $1-2\ \text{x}\ 10^8$ timocita, a talog ćelija, nakon centrifugiranja na $300\ \text{x g}$, je resuspendovan u $200\ \mu\text{l}$ rastvora hladne $0.4\ \text{M}$ perhlorne kiseline koja sadrži 0.15% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ i 0.05% Na_2EDTA (HPLC rastvor) i zamrznut na -70°C do analize.

Neposredno pre analize, uzorci sveže izolovanih timocita su odmrznuti, a uzorci tkiva timusa su homogenizovani u $400\ \mu\text{l}$ HPLC rastvora, i, zatim, centrifugirani na $30000\ \text{x g}$, 20 minuta. Dobijeni supernatanti su bili filtrirani kroz filter veličine pora $0.2\ \mu\text{m}$ i zatim iskorišćeni za analizu.

3.7.2. Reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom

Uopšteno, sistem za tečnu hromatografiju sačinjavaju dve faze: 1) stacionarna faza od poroznog materijala, smeštena u koloni, i 2) mobilna faza, odnosno tečnost koja pod pritiskom prolazi kroz sistem i u kojoj se vrši hromatografsko razdvajanje. Susptance koje se razdvajaju se selektivno adsorbuju na čestice stacionarne faze u koloni različitim afinitetom, da bi zatim sa kolone bivale spirane mobilnom fazom, dok se njihovo prisustvo i količina u uzorcima detektuju pomoću detektora. U slučaju RP-HPLC metode mobilna faza je polarna, dok je stacionarna faza nepolarna.

Detekcija i kvantifikacija kateholamina u uzorcima tkiva timusa i sveže izolovanih timocita obavljani su primenom sistema koji su sačinjavali HPLC pumpa (LC 1120, GBC, Victoria, Australija) i elektrohemijski detektor (LC 1260, GBC, Victoria, Australija) i kolona za hromatografiju ODS2 (5 μ m Column 4x250 mm, SGE, Australia Pty Ltd., Australia) ili Hibar® RT 125-4 [Pre-packed column LiChrosphere® 100 RP-18 (5 μ m), Merck, Darmstadt, Nemačka)]. Mobilna faza je sadržala 0.1 M KH_2PO_4 , 1.5 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0.1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ i 4% CH_3OH , (pH = 4.6). Zapremine od 25 μ l svakog uzorka su injektovane u brizgalicu HPLC pumpe. Sva razdvajanja su vršena pri protoku od 1 ml/min, konstantnom naponu detektora od +0.7 V i osetljivosti od 5 nA za uzorke tkiva, odnosno 2 nA za uzorke timocita. Kvantifikacija koncentracija kateholamina u uzorcima izvršena je na osnovu standardne krive, koja je konstruisana merenjem koncentracija L-noradrenalin hidrohlorida i (\pm) adrenalin hidrohlorida u odgovarajućim standardnim uzorcima. U analizi je korišćen kompjuterski program WinChrom v. 1.3 za Windows 3.11 (WinChrom Chromatography data system version 1.3, Licenced for GBC Scientific Equipment Pty Ltd.). Koncentracije kateholamina u uzorcima tkiva timusa izražene su u odnosu na masu tkiva (ng/g tkiva), a sadržaj kateholamina u timocitima, u odnosu na broj ćelija ($\text{pg}/10^6$ timocita)

3.8. DETEKCIJA KATEHOLAMINA I KVANTIFIKACIJA NJIHOVOG SADRŽAJA U NERNVIM VLAKNIMA I ĆELIJAMA TIMUSA

Identifikacija nervnih vlakana i ćelija koje sadrže kateholamine u tkivu timusa, izvršena je primenom modifikovane (Mičić i sar., 1994) SPG metode (Qayyum i Fatani, 1985).

Po izolovanju timusa, deo tkiva je izdvajan, uranjan u tečnost za zamrzavanje (Kilik, BioOptica, Milano, Italija) i čuvan na -70°C do analize. Preseci tkiva timusa, debljine 20 μm , sa pet različitih nivoa, dobijeni su upotrebom kriosekača (Kryocut E, Reichart-Jung, Austrija) i odmah zatim uranjeni u rastvor PBS (pH=7.4) koji je sadržao 1% glioksalne kiseline, 0.2 M saharoze i 0.236 M KH_2PO_4 (SPG rastvor). Nakon uranjanja u SPG rastvor, višak tečnosti je odlivan, a preseci su sušeni ujednačenom strujom hladnog vazduha. Na osušene preseke tkiva je nanošena kap mineralnog ulja (glicin/glicerolski pufer), i oni su zatim inkubirani 2.5 minuta u termostatu, na 95°C . Nakon odlivanja mineralnog ulja, preseci su prekrivani pokrovnom ljupticom. U cilju sprečavanja difuzije i razlaganja fluorescence pod uticajem svetlosti, preprati su analizirani istog dana na fluorescentnom mikroskopu Olympus BH2-RFL (Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan), korišćenjem eksitacionog (BP-405) i barijernog (Y-495) filtera, i fotografisani digitalnim fotoaparatom (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Nemačka), pomoću AnalySIS FIVE kompjuterskog programa (Olympus Soft Imaging Solutions).

S obzirom na to da izvesne subpopulacije ćelija strome timusa, koje su raspoređene, uglavnom, u nivou KMS, i na osnovu morfologije identifikovane kao MF, mogu da sadrže granule autofluorescentnog lipofuscina (Milićević i sar., 1986), na prethodno opisani način su analizirani i sukcesivni kontrolni preseci timusa, koji nisu tretirani SPG rastvorom, već samo prekrivani pokrovnom ljupticom.

3.8.1. Kvantifikacija sadržaja kateholamina u nervnim vlaknima i ćelijama timusa merenjem intenziteta fluorescentnog signala

Za digitalnu kvantifikaciju intenziteta fluorescence koju su emitovale nervna vlakna i ćelije, obuhvaćeno je po 10 testnih površina, nasumično izabranih sa pet preseka svakog timusa. Intenzitet fluorescence svakog izdvojenog fluorescentnog vlakna i autofluorescentne ćelije kvantifikovan je korišćenjem Image J programa (razvijen u Nacionalnom institutu za zdravlje, SAD; engl. National Institutes of Health), nakon prevođenja 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. Intenzitet fluorescence pozadine je meren tako što je obris svakog nervnog vlakna ili autofluorescentne ćelije pomeran na deo preparata, u

neposrednoj blizini, na kojem nije bilo fluorescentnog materijala. Ovako dobijene vrednosti oduzimane su od izmerenog intenziteta fluorescentnog signala odgovarajućeg nervnog vlakna ili autofluorescentne ćelije, da bi se izvršila korekcija za fluorescencu pozadine.

3.8.2. Kvantifikacija gustine nervnih vlakana i ćelija timusa koje sadrže kateholamine

Procentualna zastupljenost fluorescentnih nervnih vlakana je merena pod uveličanjem x40, na 10 nasumično odabranih testnih polja, sa 5 preseka timusnog tkiva po životinji, korišćenjem stereološke mrežice, metodom rešetka-tačka (engl. grid point-counting), kao što je prethodno opisano (Wernli i sar., 2009). Dobijena vrednost je izražavana kao procenat površine testnog polja koji zauzimaju fluorescentna nervna vlakna.

Gustina velikih autofluorescentnih ćelija je merena pod uveličanjem x40. Analiza je izvršena na 10 preseka tkiva timusa po životinji. Na svakom preseku je nasumično izabrano i postavljeno 30 vidnih polja, površine od 0.027 mm², Nakon određivanja ukupne površine koja je analizirana, gustina autofluorescentnih ćelija je izražena kao broj ćelija/mm².

3.9. IMUNOCITHEMIJSKO BOJENJE

3.9.1. Imunocitohemijsko bojenje izolovanih TEC, DC i ćelija epitelnih ćelijskih linija

Citospin preparati sveže izolovanih TEC i DC timusa pacova, kao i ćelija TE-R 2.5, R-TNC 1 i PC 12 ćelijskih linija su fiksirani u 4% pararozalininu, 2 minuta. Pre obeležavanja, ćelije su prvo inkubirane sa 0.5% rastvorom saponina u PBS, koji je sadržao 2% FTS i 0.01% NaN₃, 10 minuta, a zatim i sa 50% normalnog kozjeg seruma, 20 minuta. Ćelije su zatim inkubirane sa antitelima protiv TH (1:100), pan citokeratina (skup antigena karakterističan za TEC, 1:300), CD103 (1:10) i MHC II (1:500) na sobnoj temperaturi, 60 minuta. Za pravljenje razblaženja antitela, korišćen je komercijalno dostupan diluent, koji smanjuje nespecifično bojenje (Background reducing antibody diluent, DakoCytomation, Glostrup, Danska), dok je za ispiranja

između pojedinih koraka korišćen PBS. Nakon inkubacije, ćelije su tretirane reagensima Universal EnVision+ HRP sistema za detekciju (DakoCytomation), i to sekundarnim antitelima vezanim za polimer koji je obeležen peroksidazom izolovanom iz rena (engl. horseradish peroxidase), i, potom, sa rastvorom supstrata i hromogena (3,3'-diamino benzidin, DAB+), prema uputstvu proizvođača, do formiranja precipitata braon boje. Po kompletiranju procedure imunocitohemijskog bojenja, preparati su kontrastirani hematoksilinom i prekrivani pokrovnim ljupticama, korišćenjem vodenog medijuma za montiranje (Faramount aqueous mounting medium, DakoCytomation). Na preparatima kojima je dodavano samo sekundarno antitelo, ili su korišćena irelevantna primarna antitela, nije bilo uočljivog bojenja.

3.9.2. Imunocitohemijsko bojenje preseka timusa

Za utvrđivanje distribucije i karakterizaciju ćelija timusa koje sadrže TH ili ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor, kao i za njihovu kvantifikaciju, primenjene su metode jednostrukog i dvostrukog obeležavanja, korišćenjem EnVision univerzalnog sistema za dvostruko bojenje (DakoCytomation), prema preporukama proizvođača. Za sva ispiranja preseka tkiva između pojedinih faza bojenja korišćen je PBS.

Tkivo timusa je fiksirano u 10% formalinu ili fiksativu bez formalina (za imunocitohemijsko bojenje TH) i ukalupljeno u parafinske blokove. Preseci tkiva, debljine 5 μm , dobijeni upotrebom mikrotoma (Leica RM 2155, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Nemačka), su deparafinisani upotrebom ksilola, a zatim hidratizirani u seriji alkohola opadajuće koncentracije. Pre započinjanja procedure imunocitohemijskog bojenja, preseci su inkubirani u komercijalno dostupnom rastvoru za demaskiranje epitopa (Target retrieval solution, DakoCytomation), u mikrotalasnoj pećnici, 21 minut, kako bi se povratila nativna konformacija antigena ispoljenih na/u ćelijama. Aktivnost peroksidaze prisutne u ćelijama je poništena inkubacijom u vodenom rastvoru 3% H_2O_2 , za jednostruko imunocitohemijsko bojenje, dok su preseci tkiva timusa namenjeni dvostrukom imunocitohemijskom bojenju tretirani reagensom za blokiranje aktivnosti peroksidaze i alkalne fosfataze (Dual endogenous enzyme block, DakoCytomation).

3.9.2.1 Jednostruko imunocitohemijsko bojenje

Preseci tkiva timusa su inkubirani sa primarnim antitelima, protiv TH (1:100) i β_2 -adrenergičkog receptora (1:40), 60 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sa primarnim antitelima i ispiranja, na preseke tkiva su dodavana sekundarna antitela, vezana za polimer koji je obeležen peroksidazom izolovanom iz rena. Po završenoj inkubaciji, reakcija je bila okončana dodavanjem rastvora supstrata i hromogena (DAB+), dajući precipitat braon boje.

3.9.2.2. Dvostruko imunocitohemijsko bojenje

Dvostruko imunocitohemijsko bojenje izvedeno je sekvencijalnom metodom, zasnovanom na dva odvojena, uzastopna imunocitohemijska bojenja. U dvostrukim imunocitohemijskim bojenjima korišćene su kombinacije antitela protiv: TH i pan citokeratina, CD68 (ED1 antigen, karakterističan za monocite, odnosno MF, 1:100) i TH, β_2 -adrenergičkog receptora i pan citokeratina, i β_2 -adrenergičkog receptora i CD68, navedenim redosledom.

Neposredno nakon okončanja reakcije obeležavanja prvog antigena, i formiranja precipitata braon boje, preseci tkiva su tretirani reagensom za sprečavanje neželjenih interakcija između dva bojenja (doublestain block), a zatim su inkubirani sa drugim primarnim antitelom. Po završenoj inkubaciji i ispiranju, preseci su tretirani sekundarnim antitelima (Rabbit/mouse link) i, u sledećem koraku, polimerom (Polymer/AP) koji je obeležen alkalnom fosfatazom (engl. alkaline phosphatase, AP). Obeležavanje drugog primarnog antitela je okončano inkubacijom sa rastvorom supstrata i Fast red hromogena, pri čemu je nastao precipitat crvene boje.

Kao što je prethodno opisano, preparati dobijeni jednostrukim ili dvostrukim imunocitohemijskim bojenjem su kontrastirani upotrebom hematoksilina, i prekriveni pokrovnim ljusticama pomoću vodenog medijuma za montiranje. Da bi se dokazala specifičnost bojenja, korišćeni su kontrolni preseci kojima nije dodavano prvo, drugo ili nijedno od primarnih antitela, pri čemu nije dobijeno uočljivo bojenje.

Za pregled i analizu preparata korišćeni su mikroskopi Olympus AX70 (Olympus Optical Co., Hamburg, Nemačka), sa pripadajućim kompjuterskim programom AnalySIS pro 3.2 (Olympus), ili Olympus BH2-RFL (Olympus), i AnalySIS FIVE kompjuterski program (Olympus).

3.9.2.3. Kvantifikacija ćelija strome timusa koje sadrže TH i ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor

Merenje gustine ćelija strome timusa koje sadrže TH ili ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor izvršeno je na odgovarajućim jednostruko imunocitohemijski obojenim presecima tkiva timusa, upotrebom Olympus BH2-RFL (Olympus) mikroskopa, i AnalySIS FIVE kompjuterskog programa (Olympus), pod uveličanjem x40. Na svakom od preseka tkiva timusa analizirano je ukupno 30 vidnih polja, koja su nasumično postavljana u zone spoljašnjeg i unutrašnjeg korteksa (uključujući KMS) i medule. Jednak broj vidnih polja postavljen je u svakom odeljku timusa. Približno svaki četrdeseti presek timusnog tkiva, od tri preseka po eksperimentalnoj životinji, je iskorišćen za stereološko merenje numeričke gustine (broj ćelija/ μm^3 tkiva timusa) imunocitohemijski obeleženih ćelija, metodom „tačke i intersekcija“ (engl. point and intersection counting method) (Karapetrović i sar., 1995). Brojanje ćelija je obavljeno bez znanja o eksperimentalnoj životinji od koje preparat potiče, pri čemu izolovani ćelijski nastavci, sa specifično obojenim ispitivanim antigenima, nisu uzimani u obzir.

3.10. RELATIVNA KVANTIFIKACIJA EKSPRESIJE GENA METODOM LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE U REALNOM VREMENU

3.10.1. Izolacija ukupne RNK iz tkiva timusa i izolovanih timocita

3.10.1.1. Tkivo timusa

U cilju analize ekspresije gena u tkivu timusa, mali deo tkiva je, neposredno po izolovanju organa, zamrzavan u 2x koncentrovanom puferu za prečišćavanje nukleinskih kiselina (Nucleic acid purification lysis solution, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) i čuvan na -70°C , u cilju sprečavanja degradacije molekula RNK. Priprema tkiva za izolaciju ukupne RNK uključivala je njegovo odmrzavanje i homogenizaciju, nakon dvostrukog razblaživanja pufera za prečišćavanje. Homogenat tkiva timusa (150 μl) je filtriran radi uklanjanja grubljih nečistoća (kolagenog i fibroznog tkiva), a zatim je obavljeno prečišćavanje ukupne tkivne RNK. Obe procedure su obavljene upotrebom ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation, poluautomatizovanog sistema za prečišćavanje nukleinskih kiselina (Applied

Biosystems), i pripadajućih reagenasa (Total RNA chemistry starter kit, Applied Biosystems), prema uputstvu proizvođača.

3.10.1.2. Timociti

Za prečišćavanje ukupne RNK iz timocita, korišćene su supenzije sveže izolovanih ćelija u sterilnom PBS rastvoru. Iz svake suspenzije, izdvajana je zapremina u kojoj se nalazilo 5×10^6 timocita, koji su, nakon taloženja i uklanjanja supernatanta, lizirani upotrebom pufera za prečišćavanje nukleinskih kiselina (Nucleic acid purification lysis solution, Applied Biosystems) koji je prethodno bio dvostruko razblažen u PBS. Lizati ćelija su zamrznuti i čuvani na -70°C . Izolovanje ukupne RNK iz lizata timocita obavljeno je upotrebom ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation, sistema, i pripadajućih reagenasa (Total RNA chemistry starter kit).

RNK izolovana iz homogenata tkiva timusa i timocita je prečišćena od proteina, nukleaza i drugih nečistoća.

3.10.2. Prevođenje ukupne RNK u komplementarnu DNK

Prevođene ukupne sveže izolovane RNK u komplementarnu DNK (engl. complementary DNA, cDNK) reverznom transkripcijom je obavljeno upotrebom reagenasa iz High-capacity cDNA reverse transcription kompleta (Applied Biosystems), korišćenjem Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistem aparata (Applied Biosystems), prema uputstvu proizvođača. Svaka reakcija reverzne transkripcije sadržala je: 10 μl prečišćene RNK, 2 μl 10x koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju (RT Buffer), 0.8 μl mešavine 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 inhibitora RNaze (RNase inhibitor) i 3.2 μl vode koja ne sadrži nukleaze. Reverzna transkripcija se odvijala pod standardnim uslovima, koji su uključivali inkubacije od 10 minuta na temperaturi od 25°C , zatim od 120 minuta na 37°C , i, konačno, 5 sekundi na 85°C . Po 5 μl sintetisane cDNK je korišćeno u svakoj qRT-PCR reakciji.

3.10.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

qRT-PCR metoda objedinjava klasično umnožavanje lančanom reakcijom polimeraze i fluorimetriju specifične probe obeležene fluorescentnom bojom. Generalno, gensko-specifične probe koje se koriste u qRT-PCR metodi su obeležene, na jednom kraju, fluorescentnom bojom koja se naziva donorom, i na drugom kraju bojom koja se naziva akceptorom. Nakon osvetljavanja donora svetlošću diode, pobuđena fluorescentna boja emituje fluorescentni signal, koji u potpunosti apsorbuje akceptor. Kako polimeraza izolovana iz *Thermophilus aquaticus-a* (Taq polimeraza) pokazuje 5' egzonukleaznu aktivnost, u fazi elongacije produkta PCR reakcije dolazi do isecanja proba, odnosno do odvajanja donora i akceptora, što se otkriva kao povećanje fluorescence donora, koje se registruje detektorom (Cikota i sar., 2002).

Sve qRT-PCR reakcije su rađene u triplikatu, pod standardnim uslovima definisanim za Applied Biosystems 7500 Real-time PCR aparat, koji su uključivali: inkubacije od 2 minuta na 50°C, zatim od 10 minuta na 95°C, 40 ciklusa od po 15 sekundi na 95°C, i, konačno, inkubaciju u trajanju od jednog minuta na 60°C. Svaka od reakcija se odvijala u konačnoj zapremini od 25 µl, koja je pored cDNK, sadržala: 12.5 µl smeše ragenasa za merenje ekspresije gena (TaqMan Gene expression master mix, Applied Biosystems), 1.25 µl eseja specifičnog za gensku sekvencu od interesa (TaqMan Gene expression assay, Applied Biosystems) i 6.25 µl vode. U uzorcima je analizirana ekspresija gena za β_2 -adrenergički receptor, TH, DBH i MAO-A. β -aktin je služio kao unutrašnji standard, u cilju normalizacije varijacija u polaznoj količini cDNK, pošto je prethodno pokazana stabilnost ekspresije ovog gena, nezavisno od tretmana kojem su eksperimentalne životinje bile podvrgnute.

Relativna kvantifikacija ekspresije gena vršena je na osnovu ciklusa u kojem se detektuje porast intenziteta fluorescentnog signala iznad nivoa šuma (engl. threshold cycle, Ct), tokom eksponencijalne faze reakcije. Promene u ekspresiji ispitivanih iRNK su izražavane u odnosu na tzv. „kalibrator“, odnosno referentni uzorak. U svim merenjima, uzorci dobijeni iz životinja kontrolnih grupa su objedinjavani i korišćeni kao kalibrator. Analiza dobijenih rezultata vršena je upotrebom kompjuterskog programa SDS software v. 1.4.0. (Applied Biosystems), a konačan rezultat je izražavan u arbitrarnim jedinicama, kao N-puta razlika u odnosu na kalibrator (normalizovan prema β -aktinu), prema formuli:

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

pri čemu je:

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

$$\Delta Ct_{\text{uzorka}} = Ct_{\text{ciljnog transkripta}} - Ct_{\beta\text{-aktina}}$$

$$\Delta Ct_{\text{kalibratora}} = Ct_{\text{ciljnog transkripta}} - Ct_{\beta\text{-aktina}}$$

3.11. PROTOČNA CITOFLUORIMETRIJA

3.11.1. Priprema uzoraka za detekciju membranskih antigena

Suspenzije timocita i limfocita periferne krvi (1×10^6 ćelija u 100 μl FACS pufera) su taložene na 350 x g, 5 minuta na 4°C. Talog je resuspendovan u FACS puferu i ćelijske suspenzije su inkubirane 30 minuta, na ledu, na tamnom sa monoklonskim antitelima vezanim za fluorohrome, čija je koncentracija prethodno određena titracijom (direktna imunofluorescenca), ili sa neobebeženim monoklonskim antitelima, ili vezanim za biotin (indirektna imunofluorescenca). Posle dva ispiranja sa FACS puferom i jednim ispiranjem sa hladnim PBS (pH=7.4), kojem je dodato 0.09 % NaN_3 , ćelije obeležene tehnikom direktne imunofluorescence su resuspendovane u 500 μl PBS (pH=7.4), kojem je dodato 0.09% NaN_3 . Ćelije obeležene tehnikom indirektno imunofluorescence su posle tri ispiranja sa FACS puferom, inkubirane sa anti-koza sekundarnim antitelom za koje je vezan FITC ili streptavidin-PerCP konjugatom, narednih 30 min, na ledu na tamnom. Ćelije su zatim isprane dva puta sa FACS puferom, a treći put sa hladnim PBS (pH=7.4) kojem je dodato 0.09 % NaN_3 i resuspendovane u 500 μl ovog pufera.

Uz svako od korišćenih antitela, upotrebljena su irelevantna antitela odgovarajućeg izotipa (izotipske kontrole), obeležena odgovarajućim fluorohromima, u cilju definisanja eventualno prisutnog nespecifičnog bojenja.

3.11.1.1. Izolovanje DN ćelija iz suspenzija timocita tehnikom magnetnog razdvajanja

U cilju dobijanja suspenzije obogaćene najnezrelijim DN ćelijama, iz polaznih suspenzija timocita su odstranjene ćelije koje ispoljavaju CD4 i CD8 koreceptore,

tehnikom magnetnog razdvajanja (engl. magnetic activated cell sorting, MACS). 1×10^7 ćelija je resuspendovano u 100 μ l MACS pufera i inkubirano sa 10 μ l nerazblaženog monoklonskog antitela protiv CD8 koreceptora, konjugovanog sa biotinom, 30 minuta na 4°C. Nakon dva pranja sa 1ml hladnog MACS pufera (degasirani PBS sa 0.5% goveđeg serum albumina i 2mM EDTA), ćelije su resuspendovane u 60 μ l pufera i inkubirane sa po 20 μ l MicroBeads (Miltenyi Biotec, Gladbach, Nemačka) mikročestica vezanih za antitela protiv CD4 (klon W3/25) i mikročestica usmerenih protiv biotina (Miltenyi Biotec), 15 minuta na 4°C. Ćelije su zatim isprane sa 1 ml MACS pufera, istaložene na 300 x g i resuspendovane u 500 μ l MACS pufera. Ćelijske suspenzije obeležene mikročesticama su naslojene na LS kolonu (Miltenyi Biotec) u magnetnom polju Quadro MACS separatora (Miltenyi Biotec). Obeležene ćelije (ćelije koje ispoljavaju CD4 i/ili CD8 koreceptor) se vezuju za sadržaj kolone, a neobeležene ćelije (negativno selektovana frakcija, DN ćelije), koje prolaze kroz kolonu, sakupljane su i obeležavane sa monoklonskim antitelima specifičnim za CD2, CD45RC i TCR $\alpha\beta$ molekule, prema prethodno opisanom postupku za protočnu citofluorimetriju.

3.11.1.2. Izolovanje T-ćelija iz suspenzija limfocita periferne krvi tehnikom magnetnog razdvajanja

S obzirom na to da kod pacova monociti izolovani iz periferne krvi ispoljavaju CD4, a NK ćelije CD8 koreceptor (Jefferies i sar., 1985; Torres-Nagel i sar., 1992), ćelije koje ispoljavaju TCR $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$ +, T-ćelije) su izolovane iz suspenzija limfocita periferne krvi, tehnikom magnetnog razdvajanja. Ukratko, 1×10^7 limfocita periferne krvi je resuspendovano u 80 μ l MACS pufera i inkubirano sa 20 μ l antitela protiv TCR $\alpha\beta$, 30 minuta, na 4°C. Posle dva ispiranja u 1 ml MACS pufera, talog ćelija je ponovo resuspendovan u 80 μ l MACS pufera i inkubiran 15 minuta, na 4°C, sa 20 μ l anti-miš mikročestica (Miltenyi Biotec). Posle dva ispiranja u MACS puferu, ćelije su istaložene na 300 x g, resuspendovane, a suspenzija naslojena na MACS LS kolonu, u magnetnom polju Quadro MACS separatora. Obeležene ćelije, koje su ostale vezane za sadržaj kolone, (pozitivno selektovana frakcija, TCR $\alpha\beta$ + ćelije) su sakupljene i obeležavane antitelima vezanim za fluorohrome, prema prethodno opisanom protokolu za protočnu citofluorimetriju.

Primenom prethodno opisanih tehnika obeležavanja membranskih antigena, fenotipski profil timocita je ispitivan korišćenjem kombinacija antitela protiv:

- CD8, CD4 i TCR $\alpha\beta$;
- CD2, CD45RC i TCR $\alpha\beta$;
- CD90 i TCR $\alpha\beta$;
- CD69 i TCR $\alpha\beta$; i
- CD161, CD8 i TCR $\alpha\beta$.

Upotrebom istih tehnika, ispitivan je i fenotipski profil T-limfocita u perifernoj krvi, upotrebom kombinacija antitela protiv:

- CD8, CD4 i TCR $\alpha\beta$;
- CD4 ili CD8, CD45RC i CD90; i
- CD161, CD8 i TCR $\alpha\beta$.

3.11.2 Priprema uzoraka za detekciju unutarćelijskih antigena

3.11.2.1. TH ili β_2 -adrenergički receptor

Za analizu ekspresije TH ili ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora, 1×10^6 timocita je fiksirano 30 minuta, u mraku na 4°C, sa ledeno hladnim rastvorom 0.25% paraformaldehida u PBS. Nakon fiksacije, ćelije su ispirane dva puta sa 0.09% rastvorom NaN₃ u PBS, i istaložene centrifugiranjem. Membrane ćelija u talogu su permeabilizovane dodavanjem 0.5 ml PBS koji je sadržao 0.2% deterdženta Tween 20 i 0.09% NaN₃, 15 minuta, na 4°C. Posle permeabilizacije i dva ispiranja, ćelije u talogu su inkubirane sa primarnim neobebeženim antitelima, protiv TH ili protiv β_2 -adrenergičkog receptora, 30 minuta, na 4°C. Po završenoj inkubaciji, ćelije su dva puta ispirane od antitela, rastvorom 0.1 % Tween 20 u PBS, a zatim su dodavana sekundarna antitela, za koja je vezan FITC. Za obeležavanje TH, korišćena su anti-miš, a za obeležavanje β_2 -adrenergičkog receptora, anti-kunić sekundarna antitela. Posle inkubacije od 30 minuta, na 4°C u mraku i tri ispiranja sa PBS kojem je dodato 0.09 % NaN₃, ćelije su resuspendovane u 500 μ l istog pufera.

3.11.2.2. TH i CD3

Za dvostruko obeležavanje CD3 antigena i TH, 0.5×10^6 timocita je inkubirano sa antitelima protiv CD3 molekula za koja je vezan PE, 30 minuta, na 4°C u mraku. Čelije su zatim dva puta ispirane ledeno hladnim FACS puferom i fiksirane korišćenjem 0.5 ml ledeno hladnog 0.25% rastvora paraformaldehida u PBS, 30 minuta, na 4°C u mraku. Fiksirane ćelije su istaložene centrifugiranjem, resuspendovane u 0.5 ml 0.2 % rastvora Tween 20 u PBS i inkubirane 15 minuta, na 37°C u mraku, radi permeabilizacije njihovih membrana. Po završenoj inkubaciji, ćelije su dva puta ispirane sa PBS kojemu je dodato 0.09 % NaN_3 i taložene centrifugiranjem, da bi se pristupilo obeležavanju unutarćelijske TH, kao što je opisano u prethodnom odeljku.

3.11.2.3. Foxp3, CD4 i CD25

Da bi se ispitalo ispoljavanje Foxp3 molekula, ćelije su najpre obeležene antitelima protiv površinskih CD4 i CD25 molekula, a zatim podvrgnute proceduri za unutarćelijsko obeležavanje sa monoklonskim antitelom protiv Foxp3 molekula, koje je vezano za FITC (klon FJK-16s), iz standardnog kompleta eBioscience(San Diego, CA, SAD), prema uputstvu proizvođača. Ukratko, nakon bojenja membranskih antigena, prema prethodno opisanom protokolu za protočnu citofluorimetriju, ćelije su fiksirane i njihova membrana permeabilizovana upotrebom odgovarajućih reagenasa iz komercijalnog testa. Zatim, ćelije su inkubirane sa antitelom protiv Foxp3 i nakon inkubacije od 30 minuta, na 4°C u mraku, ćelije su dva puta isprane odgovarajućim puferom iz kompleta i resuspendovane u 500 μl PBS.

3.11.3. Protočno citofluorimetrijska analiza

Generalno, protočna citofluorimetrija, ili preciznije protočna fluorescentna citometrija, je tehnika kojom je moguće, uz primenu imunofluorescentnog obeležavanja antitelima za koja su vezani fluorohromi, istovremeno određivanje fizičkih svojstava ćelija (relativna veličina i granuliranost), relativne zastupljenosti ćelija koje ispoljavaju određeni antigen, kao i gustine njegovog ispoljavanja. Princip rada podrazumeva prolazak svake ćelije iz suspenzije kroz fokusirani laserski svetlosni snop, pri čemu dolazi do rasipanja svetlosti i emitovanja fluorescence. Odgovarajući detektori

aparata registruju prednje rasipanje svetlosti (engl. forward light scatter, FSC), odnosno rasipanje svetlosti pod pravim uglom (engl. side light scatter, SSC), čime se dobijaju podaci o relativnoj veličini, odnosno granuliranosti ćelije. Fluorohromi vezani za antitela kojima su obeležene ćelije bivaju pobuđeni apsorpcijom energije svetlosnog snopa, da bi, potom, emitovali svetlost veće talasne dužine, koja se naziva fluorescencom. Na osnovu fluorescence koju emituju fluorohromi vezani za antitela kojima su obeleženi unutarćelijski ili membranski antigeni, i koju registruju odgovarajući detektori, dobijaju se podaci o relativnoj brojnosti ćelija obeleženih određenim fluorohromom u ukupnoj populaciji, dok intenzitet emitovane fluorescence odgovara gustini ispoljavanja antigena po ćeliji.

U eksperimentima sprovedenim u okviru ove doktorske disertacije, korišćen je protočni citofluorimetar FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, SAD), sa argonskim jonskim laserom talasne dužine 488 nm, sposobnim da pobudi različite fluorohrome, poput FITC, PE i PerCP, koji, redom, emituju svetlost talasnih dužina od 530, 585 i 650 nm. Navedeni maksimumi emisije navedenih fluorohroma, koji su korišćeni u prethodno opisanim procedurama fluorescentnog obeležavanja, se međusobno ne preklapaju, te omogućavaju istovremenu analizu do tri antigena.

Iz svakog uzorka analizirano je 20000 ćelija, pošto su prethodno iz analize isključene mrtve ćelije i njihovi delovi, na osnovu FSC i SSC parametara. Procenat pozitivnih ćelija i srednji intenzitet fluorescence koju emituju fluorohromi vezani za upotrebljena antitela su dobijeni upotrebom kompjuterskog programa CELLQuestTM (Becton Dickinson). Analiza ekspresije CD90, TH i β_2 -adrenergičkog receptora na membrani, odnosno u unutarćelijskoj sredini timocita, podrazumevala je i merenje srednjeg intenziteta fluorescence (engl. mean fluorescence intensity, MFI), na osnovu kojeg je procenjivana gustina ekspresije ovih antigena po ćeliji.

3.11.4. Analiza zastupljenosti timocita u apoptozi

Ispitivanje relativne brojnosti ćelija u apoptozi u suspenzijama timocita, i određivanje njihovog fenotipa, izvršeno je na osnovu trostrukog obeležavanja ćelija antitelima protiv CD4 (za koja je vezan PE) i CD8 (za koja je vezan FITC) koreceptora i fluorescentnom bojom 7-AAD, kao što su opisali Gogal i saradnici (2000). Sveže

izolovani timociti (0.5×10^6 ćelija) su inkubirani sa navedenim monoklonskim antitelima 30 minuta, na 4°C u mraku, i, nakon inkubacije, dva puta isprani sa FACS puferom. Ćelije su, zatim, inkubirane sa $5 \mu\text{l}$ fluorescentne boje 7-AAD, koja se vezuje za DNK, 20 minuta, na 4°C u mraku. Analiza bojenja obavljena je pomoću protočnog citofluorimetra FACScan i kompjuterskog programa CELLQuestTM (BD Biosciences). Procenat ćelija u apoptozi, u ukupnoj populaciji timocita, ili pojedinim subpopulacijama koje su izdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani, određivan je na osnovu vrednosti intenziteta fluorescence 7-AAD i FSC parametra. Naime, 7-AAD omogućava identifikaciju: 1) živih ćelija normalne morfologije i integriteta membrane, koje ne vezuju 7-AAD (7-AAD-), 2) ćelija u ranim fazama apoptoze, izmenjene morfologije (manji FSC) i sa znacima promena u membrani, koje vezuju 7-AAD niskim afinitetom (7-AAD+), i 3) ćelije u odmaklim, kasnim, fazama apoptoze, manje po veličini (još manji FSC) i sa gubitkom integriteta membrane, koje vezuju 7-AAD visokim afinitetom (7-AAD++) (Lecoeur i sar., 1997). Ukupan procenat ćelija u apoptozi je dobijen sabiranjem procenata 7-AAD+ i 7-AAD++ ćelija.

3.11.5. Analiza zastupljenosti timocita u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa

Ispitivanje proliferacije timocita, u ukupnoj populaciji ili u okviru pojedinih subpopulacija ovih ćelija, izvršeno je na osnovu obeležavanja ćelija antitelima protiv CD4 (za koja je vezan PE) i CD8 (za koja je vezan FITC) koreceptora i vezivanja fluorescentne boje 7-AAD za DNK (Rabinovitch i sar., 1986). Sveže izolovani timociti (0.5×10^6 ćelija) su inkubirani sa prethodno navedenim antitelima protiv CD4 i CD8 koreceptora, 30 minuta, na 4°C u mraku i, zatim, dva puta isprani sa FACS puferom. Nakon taloženja, ćelije su resuspendovane u $150 \mu\text{l}$ PBS koji je sadržao 50% FTS i 0.09% NaN_3 , a potom im je dodato $450 \mu\text{l}$ ledeno hladnog 70 % etanola, u kapima uz mešanje, u cilju fiksiranja ćelija i permeabilizacije njihove membrane. Ova tehnika obezbeđuje dobru očuvanost membranski ispoljenih antigena, stabilnu vezu antigena i antitela i optimalnu propustljivost ćelijske membrane za preciznu kvantifikaciju sadržaja DNK. Ćelije su inkubirane preko noći na 4°C i istaložene centrifugiranjem na $300 \times g$. Da bi se odstranili etanol i proteinski precipitati, ćelije su isprane, prvo u FACS puferu, a zatim u 0.09% rastvoru NaN_3 u PBS i inkubirane sa $10 \mu\text{l}$ 7-AAD 30 minuta,

na 4°C u mraku. Uzorci su zatim analizirani na protočnom citofluorimetru FACScan, pomoću CELLQuest™ kompjuterskog programa (BD Biosciences). Rezultati kombinovanog površinskog bojenja ćelija i sadržaja DNK su dobijeni učitavanjem logaritamskog pojačanja površinske fluorescence i linearnog pojačanja 7-AAD fluorescence. Eventualno prisutni dubleti ćelija su isključeni iz analize pomoću modula za razlikovanje dubleta ćelija (engl. doublet discriminating module), koji razdvaja visinu 7-AAD fluorescentnog signala (engl. 7-AAD Height) na širinu (engl. 7-AAD Width) i površinu (7-AAD Area).

3.12. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi podaci su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška (engl. standard error of the mean, S.E.M.). U prvoj grupi eksperimenata, za utvrđivanje statističkih značajnosti razlika između grupa primenjen je Studentov t-test (engl. Student's t-test). Statistička analiza podataka dobijenih kvantifikacijom ekspresije gena (Δ Ct vrednosti) izvršena je upotrebom neparametarskog Man-Vitni U-testa (engl. Mann-Whitney U-test). U drugoj grupi eksperimenata, za ispitivanje efekata tretmana propranololom kod neorhidektomisanih pacova, korišćeni su Studentov t-test i Man-Vitni U-test, kao što je prethodno opisano. Statistička značajnost razlika u efektima tretmana propranololom kod neorhidektomisanih i orhidektomisanih životinja utvrđivana je primenom dvofaktorske analize varijanse (engl. Two-way analysis of variance), koja je praćena naknadnim Bonferonijevim testom (engl. Bonferroni test for post-hoc comparisons). U analizama su korišćeni statistički programi SPSS 10.0 for Windows i GraphPad Prism v 5.0. Razlike su smatrane statistički značajnim za p vrednost < 0.05 .

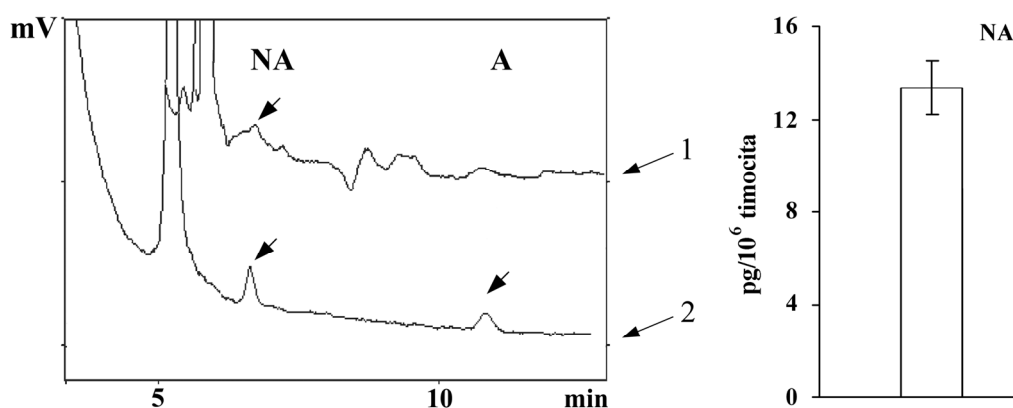
4. REZULTATI

4.1. SINTEZA KATEHOLAMINA U TIMOCITIMA I ČELIJAMA STROME TIMUSA ODRASLIH MUŽJAKA PACOVA

Imajući u vidu činjenicu da zreli limfociti (Musso i sar., 1996; Qiu i sar., 2005), kao i B- i T-ćelijski hibridomi (Cosentino i sar., 2000) sintetišu kateholamine, u prvom delu istraživanja ispitivano je prisustvo, odnosno sinteza kateholamina u timocitima odraslih mužjaka pacova.

4.1.1. Timociti odraslih mužjaka pacova sadrže noradrenalin

Merenjem sadržaja kateholamina u sveže izolovanim timocitima odraslih mužjaka pacova utvrđeno je da ove ćelije sadrže merljive količine noradrenalina (Slika 1).



Slika 1. Merenje sadržaja noradrenalina u timocitima odraslih mužjaka pacova.

A. Hromatogram reprezentativnog (linija 1) uzorka sveže izolovanih timocita mužjaka pacova i (linija 2) smeše standarda sačinjene od 10 ng/ml noradrenalina (NA) i 10 ng/ml adrenalina (A) u 0.4 M perhlornoj kiselini. Strelice označavaju pikove koji odgovaraju NA i A.

B. Histogram prikazuje sadržaj NA u timocitima.

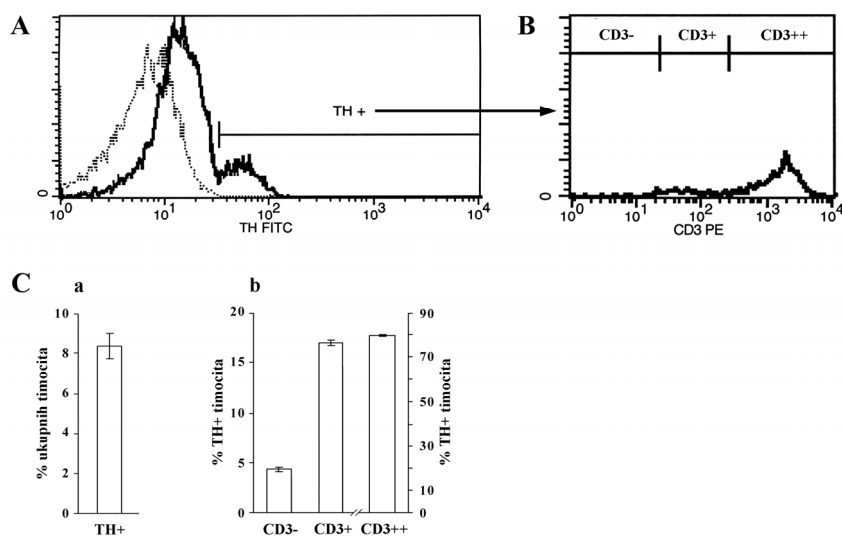
Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. (n=6).

Iako je u sveže izolovanim timocitima detekovan i dopamin, sadržaj ovog medijatora u ovim uzorcima je bio ispod granice pouzdanog merenja. Budući da limfociti pripadaju retkim nenervnim ćelijama koje se odlikuju sposobnošću preuzimanja monoamina iz okruženja (Faraj i sar., 1991), moglo se postaviti pitanje da li noradrenalin u ovim ćelijama potiče od hormona/neurotransmitera koji je preuzet iz njihovog okruženja, ili je nastao sintezom u samim ćelijama.

4.1.2. Timociti odraslih mužjaka pacova sintetišu kateholamine

4.1.2.1. Analiza ekspresije tirozin hidrosilaze protočnom citofluorimetrijom

Da bi se utvrdilo da li timociti sintetišu kateholamine, u sveže izolovanim timocitima odraslih pacova, korišćenjem protočne citofluorimetrije, ispitana je ekspresija TH, ključnog enzima u biosintezi kateholamina. Analizom je pokazano prisustvo imunoreaktivne TH u timocitima (Slika 2). Na osnovu analize ispoljavanja CD3 molekula na membrani timocita, pokazano je da se timociti koji sadrže TH (TH+ timociti) mogu naći u subpopulacijama ćelija koje ne ispoljavaju merljive količine CD3 molekula (CD3-), ali i onima koje ispoljavaju CD3 sa niskom (CD3+) i visokom (CD3++) gustinom. Najveći procenat TH+ timocita je pokazivao najzreliji CD3++ fenotip (Slika 2).



Slika 2. Protočno citofluorimetrijska analiza ekspresije tirozin hidrosilaze u timocitima odraslih mužjaka pacova i fenotipskog profila ćelija koje sadrže tirozin hidrosilazu na osnovu ispoljavanja CD3 molekula.

A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski histogram ekspresije tirozin hidrosilaze (TH) u uzorku timocita koji su sveže izolovani iz timusa mužjaka pacova (puna linija). Isprekidana linija predstavlja izotipsku kontrolu.

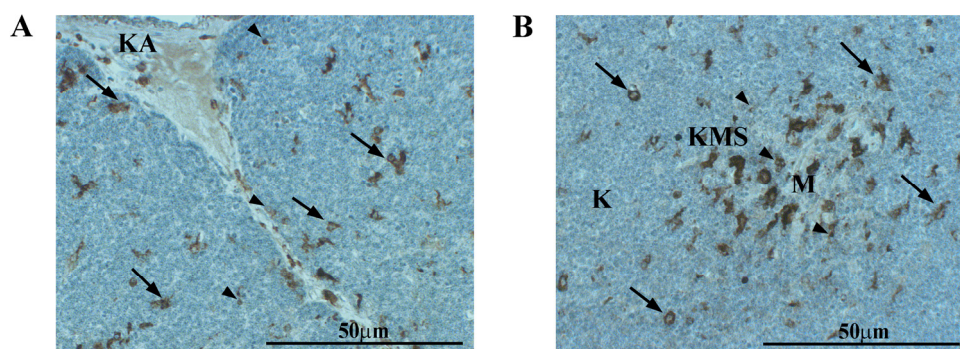
B. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski histogram ispoljavanja CD3 molekula na membrani timocita koji sadrže TH (TH+), koji su izdvojeni kao što je prikazano na histogramu (A). CD3-, nemerljiva površinska gustina; CD3+, niska površinska gustina; CD3++, visoka površinska gustina.

C. Histogrami prikazuju (a) procentualnu zastupljenost TH+ timocita i (b) procentualnu zastupljenost CD3-, CD3+ i CD3++ ćelija, u okviru ukupne subpopulacije TH+ ćelija.

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. (n=6).

4.1.2.2. Analiza lokalizacije timocita koji eksprimiraju tirozin hidroksilazu

Imunocitohemijskim bojenjem preseka tkiva timusa, utvrđena je distribucija timocita koji eksprimiraju TH. Topografija ovih ćelija je u potpunosti odgovarala podacima dobijenim protočnom citofluorimetrijom. Naime, ćelije koje su na osnovu morfologije i prečnika identifikovane kao timociti, uočene su, uglavnom, u nivou medularne strane KMS, kao i u supkapsularnom korteksu, a samo retko unutar medule i korteksa (Slika 3).



Slika 3. Imunocitohemijska analiza ekspresije tirozin hidroksilaze u timusu odraslih mužjaka pacova.

A, B. Reprezentativne fotomikrografije ilustruju imunocitohemijsko bojenje, korišćenjem antitela protiv tirozin hidroksilaze (TH), **(A)** spoljašnjeg korteksa i **(B)** kortiko-medularne spojnice i medule tkiva timusa. Vrhovi strelica označavaju timocite koji sadrže TH (TH+). Strelice označavaju TH+ ćelije strome timusa.

KA, kapsula; K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica; M, medula. Originalno uveličanje, x10.

4.1.2.3. Analiza ekspresije gena koji kodiraju enzime uključene u sintezu i degradaciju kateholamina

U prilog prethodno iznetim podacima, koji su pokazali da timociti pacova sintetišu kateholamine, išli su i podaci dobijeni analizom ekspresije gena koji kodiraju enzime uključene u sintezu i degradaciju kateholamina. U suspenzijama sveže izolovanih timocita je pokazana merljiva ekspresija iRNK koja kodira TH, ali i DBH, enzim koji katalizuje sintezu noradrenalina iz dopamina (podaci nisu prikazani). Osim toga, u timocitima je detektovano i prisustvo iRNK za MAO-A, enzim koji katalizuje oksidaciju monoamina (podaci nisu prikazani).

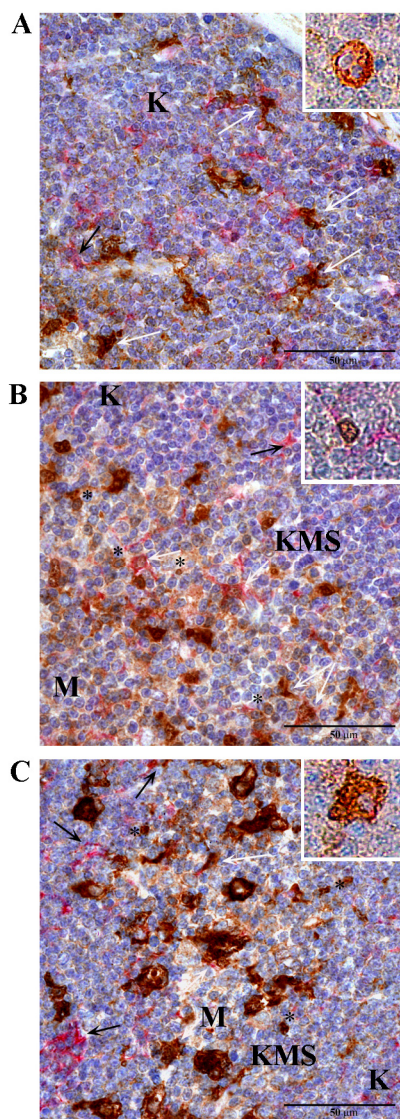
4.1.3. Čelije strome timusa odraslih mužjaka pacova sintetišu kateholamine

Imunocitohemijskim bojenjem TH na presecima tkiva timusa, utvrđeno je da, pored timocita, i brojne čelije strome timusa sadrže TH. Pokazalo se da ove, morfološki heterogene čelije, imaju distribuciju sličnu onoj kod TH+ timocita. Drugim rečima, TH+ čelije strome timusa su, uglavnom, bile raspoređene supkapsularno i na medularnoj strani KMS, dok su izuzetno retko uočavane u unutrašnjosti korteksa i medule (Slika 3).

4.1.3.1. Timusne epitelne čelije sintetišu kateholamine

U sledećem koraku, ispitivan je tip ćelija strome timusa koje sadrže TH. Dvostrukim imunocitohemijskim bojenjem preseka tkiva timusa korišćenjem antitela protiv TH i pan citokeratina (skup antigena karakterističan za TEC), dobijena je tipična „mreža“ TEC, u okviru koje su uočene brojne čelije, istovremeno pan citokeratin+ i TH+ (Slika 4).

Dalja karakterizacija TH+ ćelija epitelne „mreže“ timusa je obuhvatila i imunocitohemijsko bojenje TH u izolovanim ćelijama strome timusa, obogaćenim epitelnom komponentom, i epitelnim ćelijskim linijama. Uočeno je slabo bojenje u timusnim ćelijama „dadijama“, kao i u TEC koje formiraju rozete sa timocitima (Slika 5). Nasuprot tome, u ćelijama ćelijskih linija R-TNC 1 (linija ćelija korteksa, koje pokazuju ultrastrukturne i fenotipske karakteristike cTEC tipa 2 ili 3) (Čolić i sar, 1994) i TE-R 2.5 (linija ćelija medule, koje pokazuju ultrastrukturne i fenotipske karakteristike mTEC tipa 6) (Čolić i sar., 1992), imunocitohemijsko bojenje TH nije dalo pozitivne rezultate (Slika 5).



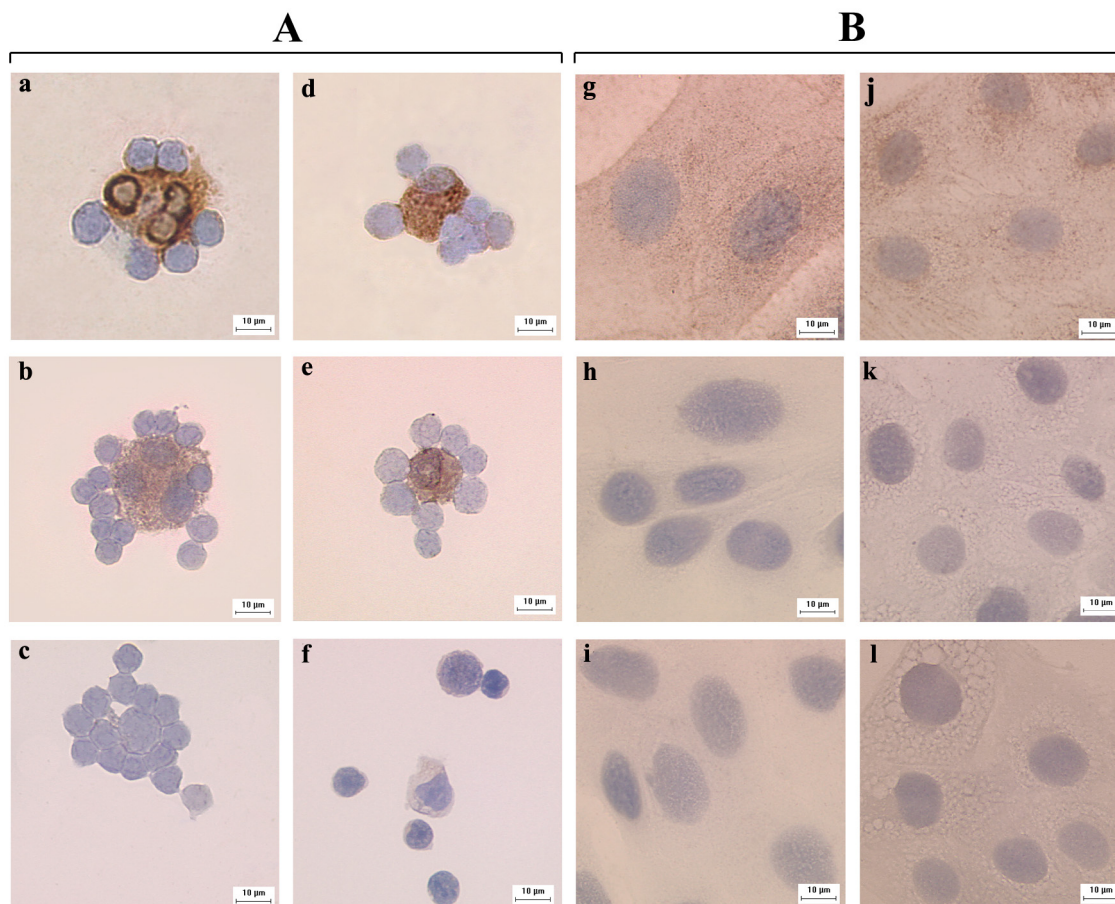
Slika 4. Imunocitohemijska analiza ekspresije tirozin hidroksilaze u epitelnim ćelijama timusa odraslih mužjaka pacova.

A, B, C. Reprezentativne fotomikrografije ilustruju dvostruko imunocitohemijsko bojenje, korišćenjem antitela protiv tirozin hidroksilaze (TH) i pan citokeratina (CK), (**A**) korteksa, (**B**) kortiko-medularne spojnice i (**C**) medule tkiva timusa. Fotomikrografije prikazuju timocite koji sadrže TH (TH+) tamno braon boje (zvezdice), timusne epitelne ćelije sa crveno obojenim citoplazmatskim CK (CK+) (crne strelice) i timusne epitelne ćelije čija je citoplazma dvostruko obeležena korišćenjem antitela protiv TH i CK, braon-crvene boje (bele strelice).

K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica M, medula; originalno uveličanje, x40.

Umeci: **A.** Dvostruko obojena TH+ i CK+ ćelija nalik na ćelije „dadilje“; **B.** Jednostruko obojen, TH+ timocit; **C.** Dvostruko obojena TH+ i CK+ ćelija.

Originalno uveličanje x100.



Slika 5. Imunocitohemijska analiza ekspresije tirozin hidroksilaze u izolovanim epitelnim ćelijama timusa odraslih mužjaka pacova i linijama timusnih epitelnih ćelija.

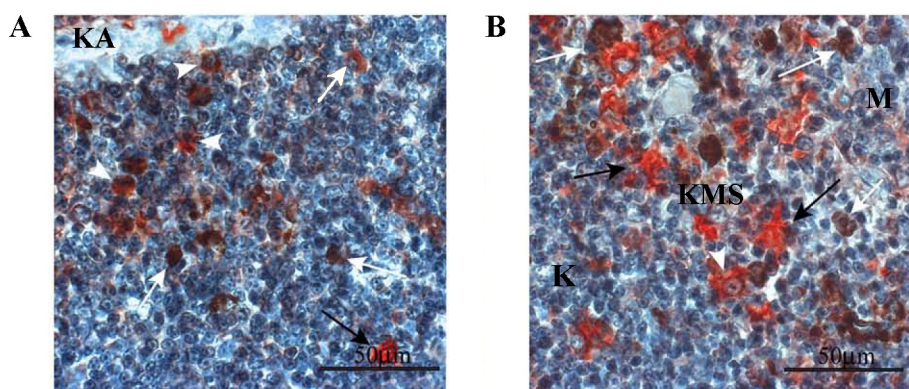
A. Fotomikrografije prikazuju imunocitohemijsko bojenje: **1)** timusnih ćelija „dadilja“, korišćenjem **(a)** antitela protiv pan citokeratina (CK), **(b)** antitela protiv tirozin hidroksilaze (TH) i **(c)** samo sekundarnog antitela (negativna kontrola), i **2)** timusnih epitelnih ćelija, korišćenjem **(d)** antitela protiv CK i **(e)** antitela protiv TH, i **(f)** samo sekundarnog antitela (negativna kontrola).

B. Fotomikrografije prikazuju imunocitohemijsko bojenje: **1)** ćelija TE-R 2.5 medularne linije, korišćenjem **(g)** antitela protiv CK, **(h)** antitela protiv TH i **(i)** samo sekundarnog antitela (negativna kontrola), i **2)** ćelija R-TNC 1 kortikalne linije, korišćenjem **(j)** antitela protiv CK, **(k)** antitela protiv TH, i **(l)** samo sekundarnog antitela (negativna kontrola). Treba uočiti odsustvo bojenja: svih tipova ćelija **(c, f, i, l)**, korišćenjem samo sekundarnog antitela i ćelija **(h)** TE-R 2.5 i **(k)** R-TNC 1 linija, korišćenjem antitela protiv TH.

Originalno uveličanje, x100.

4.1.3.2. Timusne makrofage sintetišu kateholamine

Imajući u vidu da nisu sve TH⁺ ćelije strome timusa bile i pan citokeratin⁺, postavilo se pitanje koji još tipovi ćelija strome sadrže TH. Da bi se odgovorilo na ovo pitanje, izvršeno je dvostruko obeležavanje preseka tkiva timusa, korišćenjem antitela protiv TH i CD68 molekula (ED1, antigen karakterističan za monocite, odnosno MF), i pokazana je kolokalizacija TH i CD68 molekula u ćelijama smeštenim supkapsularno i subtrabekularno, u korteksu, kao i u nivou KMS (Slika 6).



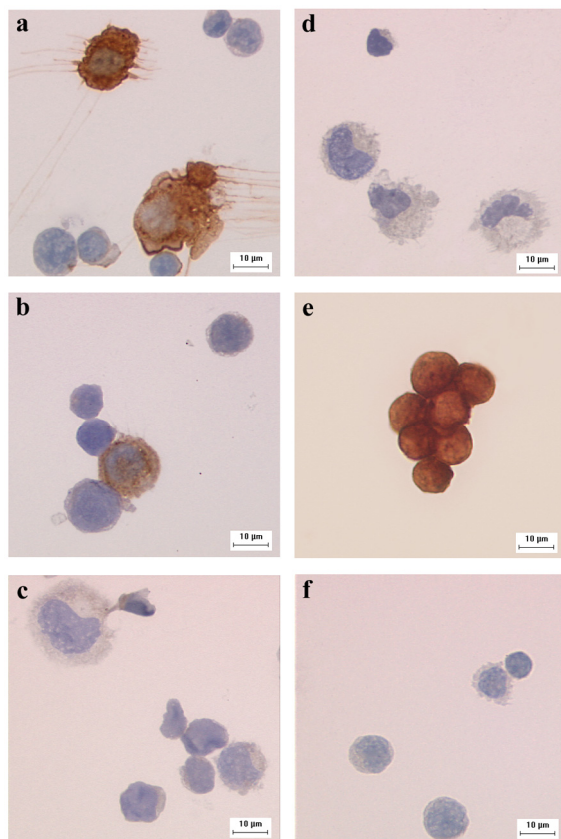
Slika 6. Imunocitohemijska analiza ekspresije tirozin hidroksilaze u makrofagama timusa odraslih mužjaka pacova.

A, B. Reprezentativne fotomikrografije ilustruju dvostruko imunocitohemijsko bojenje, korišćenjem antitela protiv tirozin hidroksilaze (TH) i CD68 (ED1) molekula, **(A)** korteksa i **(B)** kortiko-medularne spojnice i medule tkiva timusa. Fotomikrografije prikazuju makrofage koji ispoljavaju CD68, sa tamno braon citoplazmatskim bojenjem (bele strelice), timusne makrofage dvostruko obeležene korišćenjem antitela protiv TH i CD68, identifikovane braon-crvenim bojenjem (beli vrhovi strelica) i ćelije strome timusa jednostruko obeležene korišćenjem antitela protiv TH, identifikovane crvenim bojenjem (crne strelice).

KA, kapsula; K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica; M, medula. Originalno uveličanje, x40.

4.1.3.3. Timusne dendritske ćelije ne sintetišu kateholamine

Imunocitohemijskim bojenjem sveže izolovanih DC (Slika 7), pokazano je da ove ćelije, za razliku od TEC i MF, ne sadrže detektabilne količine imunoreaktivne TH.



Slika 7. Imunocitohemijska analiza ekspresije tirozin hidroksilaze u izolovanim dendritskim ćelijama timusa odraslih mužjaka pacova

Fotomikrografije prikazuju imunocitohemijsko bojenje: **1**) sveže izolovanih DC, korišćenjem **(a)** antitela protiv MHC II molekula, **(b)** antitela protiv CD103 integrina, **(c)** antitela protiv tirozin hidroksilaze (TH) i **(d)** samo sekundarnog antitela (negativna kontrola), i **2**) ćelija PC 12 linije, korišćenjem **(e)** antitela protiv TH (pozitivna kontrola) i **(f)** samo sekundarnog antitela (negativna kontrola). Treba uočiti odsustvo bojenja: oba tipa ćelija **(d, f)**, korišćenjem samo sekundarnog antitela i **(c)** sveže izolovanih DC, korišćenjem antitela protiv TH.

Originalno uveličanje, x100.

4.2. ISPOLJAVANJE β_2 -ADRENERGIČKOG RECEPTORA U TIMOCITIMA I ĆELIJAMA STROME TIMUSA ODRASLIH MUŽJAKA PACOVA

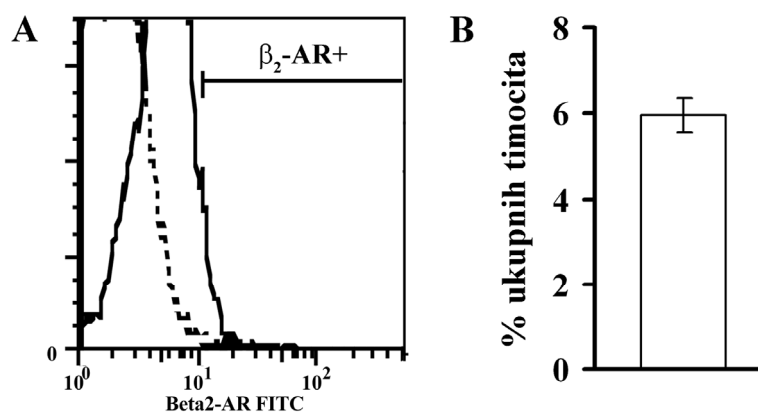
S obzirom na to da su efekti kateholamina u imunskom sistemu posredovani, pre svega, β_2 -adrenergičkim receptorom (Kohm i Sanders, 2001), ispitivano je ispoljavanje receptora ovog tipa u timocitima i ćelijama strome timusa odraslih mužjaka pacova.

4.2.1. Timociti odraslih mužjaka pacova ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor

Kao što je bilo očekivano, prema raspoloživim literaturnim podacima (Singh i Owen, 1976; Singh i sar., 1979; Fuchs i sar., 1988.), analiza protočnom citofluorimetrijom je pokazala da timociti odraslih mužjaka pacova ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor (Slika 8).

Imunocitohemijskim bojenjem preseka tkiva timusa, potvrđeno je prisustvo β_2 -adrenergičkog receptora na membrani timocita (Slika 9). Timociti koji ispoljavaju β_2 -

adrenergički receptor su bili raspoređeni kroz sve delove korteksa organa, dok je u nivou medule njihovo prisustvo bilo izuzetno retko (Slika 9).

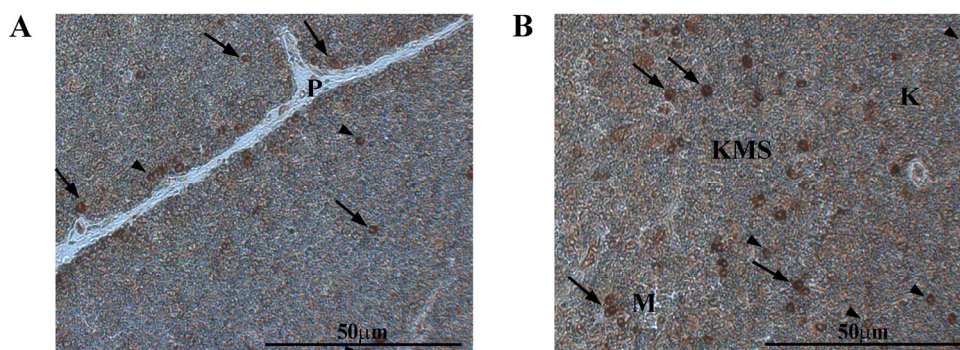


Slika 8. Protočno citofluorimetrijska analiza ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora u timocitima odraslih mužjaka pacova.

A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski histogram ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora (β_2 -AR) u uzorku timocita koji su sveže izolovani iz timusa mužjaka pacova (puna linija). Isprekidana linija predstavlja izotipsku kontrolu.

B. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost timocita koji ispoljavaju β_2 -AR (β_2 -AR+).

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. (n=6).



Slika 9. Imunocitohemijska analiza ispoljavajnja β_2 -adrenergičkog receptora u timusu odraslih mužjaka pacova.

A, B. Reprezentativne fotomikrografije ilustruju imunocitohemijsko bojenje, korišćenjem antitela protiv β_2 -adrenergičkog receptora (β_2 -AR), (**A**) spoljašnjeg korteksa i (**B**) kortiko-medularne spojnice i medule tkiva timusa. Vrhovi strelica označavaju timocite koji ispoljavaju β_2 -AR (β_2 -AR+). Strelice označavaju β_2 -AR+ ćelije stome timusa.

P, vezivna pregrada; K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica; M, medula. Originalno uveličanje, x10.

Konačno, ekspresija β_2 -adrenergičkog receptora je potvrđena detekcijom iRNK za ovaj receptor, u suspenzijama sveže izolovanih timocita (podaci nisu prikazani).

4.2.2. Čelije strome timusa odraslih mužjaka pacova ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor

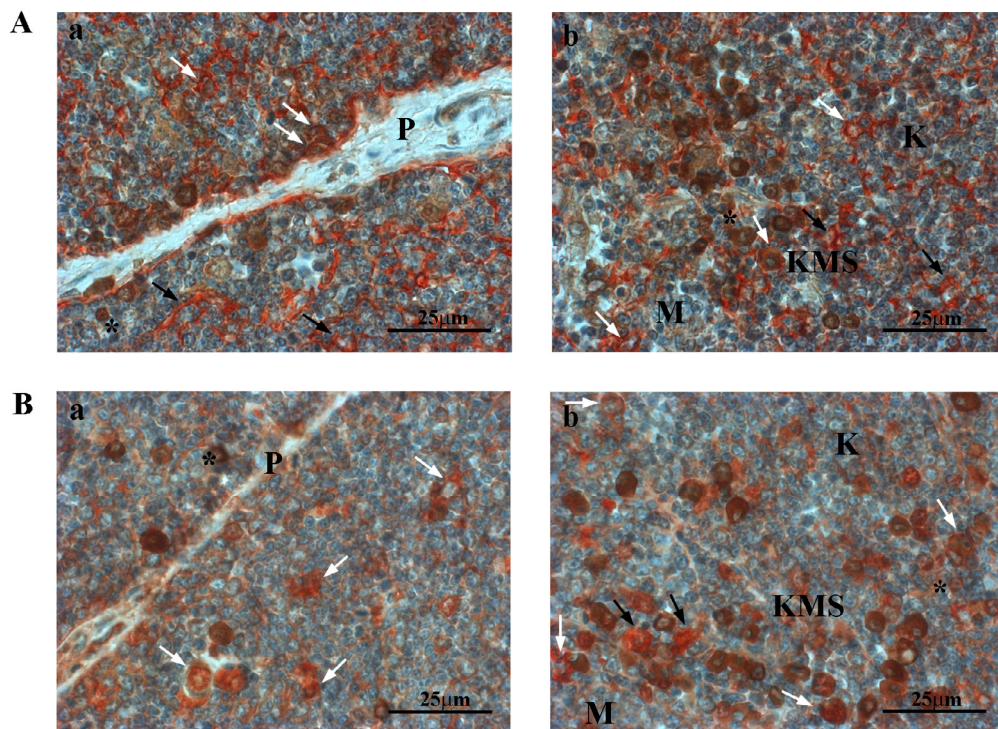
Imunocitohemijskim bojenjem je pokazano prisustvo imunoreaktivnog β_2 -adrenergičkog receptora na membrani ćelija strome timusa. Ove ćelije su, uglavnom, bile uočene u supkapsularnom/subtrabekularnom odeljku timusa, kao i u KMS, dok su u meduli bile izuzetno retke (Slika 9). Pošto je pokazano da i ćelije strome timusa ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor, pristupilo se određivanju tipova ćelija koje ispoljavaju ovaj receptor, metodom dvostrukog imunocitohemijskog bojenja.

4.2.2.1. Timusne epitelne ćelije ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor

Dvostruko imunocitohemijsko bojenje je pokazalo da subpopulacija TEC, uočena, uglavnom, u nivou KMS ispoljava β_2 -adrenergički receptor (ćelije istovremeno imunoreaktivne na β_2 -adrenergički receptor i pan citokeratin) (Slika 10).

4.2.2.2. Timusne makrofage ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor

Dvostruko imunocitohemijsko bojenje je pokazalo da subpopulacija ćelija koje ispoljavaju CD68 molekul, ispoljava i β_2 -adrenergički receptor. Ove ćelije su bile uočene kako u nivou KMS, tako i u supkapsularnom odeljku timusa (Slika 10).



Slika 10. Imunocitohemijska analiza ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora u epitelnim ćelijama i makrofagama timusa odraslih mužjaka pacova.

Reprezentativne fotomikrografije ilustruju dvostruko imunocitohemijsko bojenje, korišćenjem antitela protiv (A) β_2 -adrenergičkog receptora (β_2 -AR) i pan citokeratina (CK) i (B) β_2 -AR i CD68 (ED1) molekula, (a) korteksa i (b) kortiko-medularne spojnice i medule tkiva timusa.

A. Fotomikrografije prikazuju timocite koji ispoljavaju β_2 -AR (β_2 -AR+) tamno braon boje (zvezdice), timusne epitelne ćelije sa crveno obojenim citoplazmatskim CK (crne strelice) i timusne epitelne ćelije dvostruko obeležene korišćenjem antitela protiv β_2 -AR i CK, braon-crvene boje (bele strelice).

B. Fotomikrografije prikazuju β_2 -AR+ timocite tamno braon boje (zvezdice), timusne makrofage sa crveno obojenim citoplazmatskim CD68 molekulom (crne strelice) i timusne makrofage dvostruko obeležene korišćenjem antitela protiv β_2 -AR i CD68 molekula, braon-crvene boje (bele strelice).

P, vezivna pregrada; K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica; M, medula; Originalno uveličanje, x40.

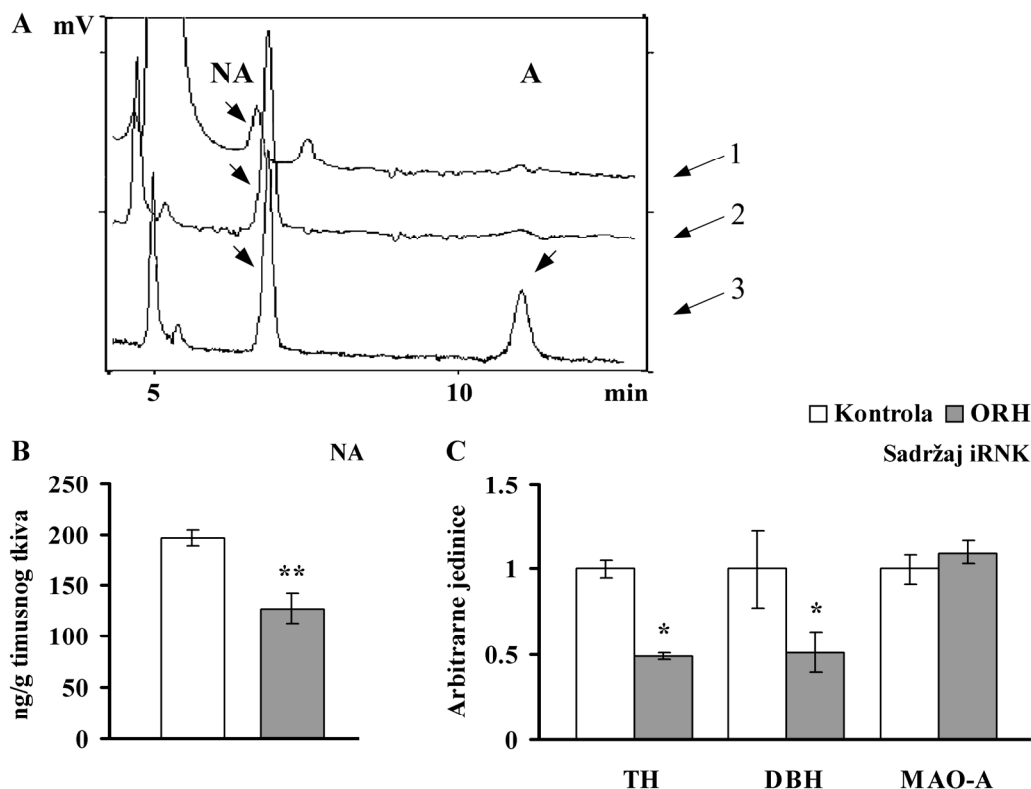
4.3. UTICAJ ORHIDEKTOMIJE U UZRASTU OD 30 DANA NA KONCENTRACIJU KATEHOLAMINA I ISPOLJAVANJE β_2 -ADRENERGIČKOG RECEPTORA U TIMUSU ODRASLIH PACOVA

4.3.1. Uticaj orhidektomije na koncentraciju noradrenalina u timusu

Na osnovu brojnih podataka o uticaju polnih hormona na sintezu kateholamina u različitim tkivima (Arbogast i Voogt, 1994; Kumai i sar., 1995), postavilo se pitanje da li ovi steroidi deluju slično i na timus. Da bi se dobio odgovor na ovo pitanje, merene su koncentracije noradrenalina u timusu odraslih mužjaka pacova koji su orhidektomisani 30. postnatalnog dana.

Merenjem je pokazano da uklanjanje hormona testisa dovodi do značajnog ($p < 0.01$) smanjenja koncentracije noradrenalina u timusu pacova (Slika 11). Merenje ekspresije gena je pokazalo da kod orhidektomisanih pacova, u poređenju sa lažno operisanim kontrolnim životinjama, dolazi do značajnog ($p < 0.05$) smanjenja nivoa mRNA koja kodira TH, kao i DBH, čemu bi se moglo pripisati prethodno navedeno smanjenje koncentracije noradrenalina u timusu ovih životinja (Slika 11).

U cilju identifikovanja izvora noradrenalina koji su doprineli smanjenju njegove koncentracije u timusu orhidektomisanih životinja, ispitivana je gustina autofluorescentnih vlakana i ćelija koje sadrže kateholamine u timusu, i intenzitet fluorescence koju emituju ova vlakna i ćelije, kao odraz sadržaja hormona/neurotransmitera u njima, kao i zastupljenost timocita koji sintetišu kateholamine i sadržaj noradrenalina u njima.



Slika 11. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na koncentraciju noradrenalina i ekspresiju gena za enzime uključene u sintezu i degradaciju kateholamina u timusu odraslih pacova.

A. Hromatogrami reprezentativnih uzoraka tkiva timusa koje je sveže izolovano iz (linija 1) orhidektomisanih (ORH) i (linija 2) lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova, kao i (linija 3) smeše standarda sačinjene od 100 ng/ml noradrenalina (NA) i 100 ng/ml adrenalina (A) u 0.4 M perhlornoj kiselini. Strelice označavaju pikove koji odgovaraju NA i A.

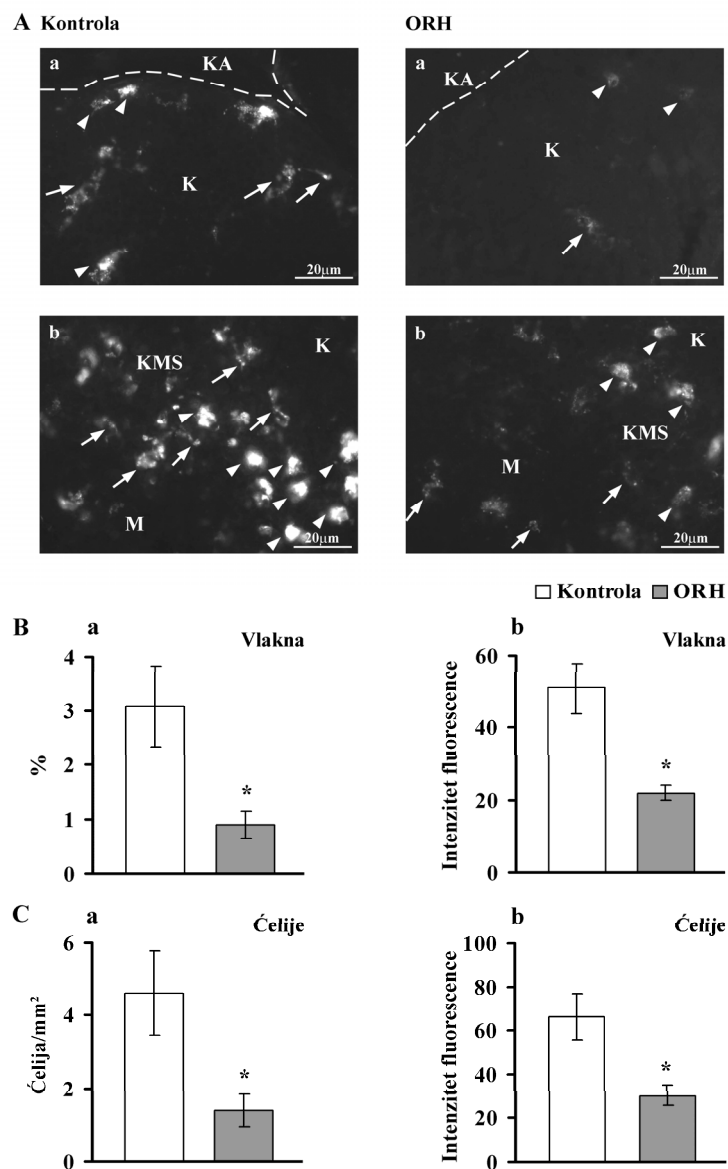
B. Histogram prikazuje koncentraciju NA u tkivu timusa ORH i kontrolnih pacova.

C. Histogram prikazuje sadržaj iRNK za tirozin hidroksilazu (TH), dopamin- β -hidroksilazu (DBH) i monoamino-oksidadu-A (MAO-A) u tkivu timusa ORH i kontrolnih pacova.

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

4.3.1.1. Uticaj orhidektomije na gustinu simpatičkih nervnih vlakana u timusu i sadržaj kateholamina u njima

Da bi se procenio doprinos simpatičkih nervnih vlakana smanjenju koncentracije noradrenalina u timusu orhidektomisanih pacova, izvršena je analiza preseka tkiva timusa, nakon tretmana SPG rastvorom. Pokazano je da su i gustina autofluorescentnih nervnih vlakana i intenzitet fluorescentnog signala koji ova vlakna emituju, kao indirektna mera sadržaja, najverovatnije, noradrenalina u njima, značajno ($p < 0.05$) smanjeni u timusu orhidektomisanih pacova, u odnosu na kontrolne životinje (Slika 12).



Slika 12. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na gustinu nervnih vlakana i ćelija strome koje sadrže kateholamine i sadržaj kateholamina u njima u timusu odraslih pacova.

A. Reprezentativne fotomikrografije preseka tkiva timusa tretiranih rastvorom saharoza-fosfat-glioksalna kiselina (SPG) prikazuju fluorescentna nervna vlakna (strelice) i ćelije (vrhovi strelica) u **(a)** korteksu i **(b)** kortiko-medularnoj spojnici i meduli (desno) orhidektomisanih (ORH) i (levo) lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova. Isprekidana linija prikazuje granicu između kapsule i korteksa timusa.

KA, kapsula; K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica; M, medula. Originalno uveličanje, x40.

B. Histogrami prikazuju **(a)** gustinu (procenat površine testnog polja koji zauzimaju nervna vlakna) i **(b)** intenzitet emitovanog fluorescentnog signala nervnih vlakana u timusu ORH i kontrolnih pacova.

C. Histogrami prikazuju **(a)** gustinu (broj ćelija/mm²) i **(b)** intenzitet emitovanog fluorescentnog signala ćelija strome timusa ORH i kontrolnih pacova.

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. (n=6). * p<0.05.

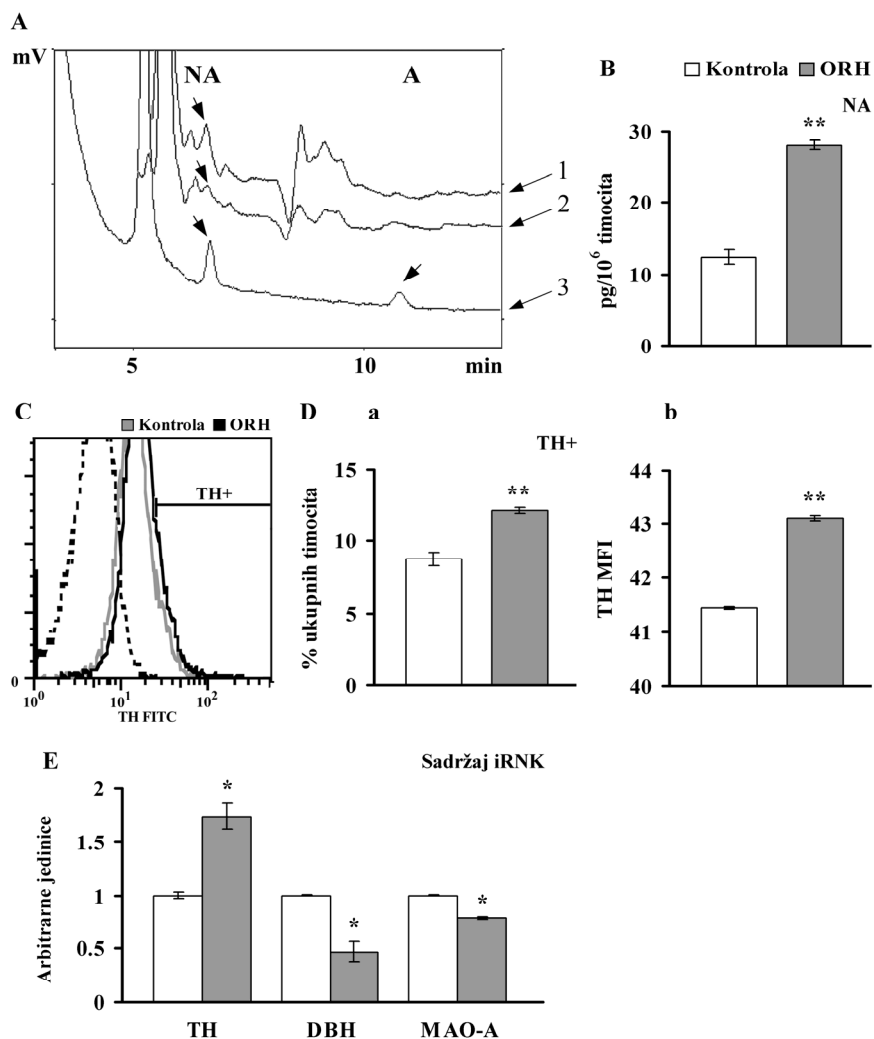
4.3.1.2. Uticaj orhidektomije na procentualnu zastupljenost timocita koji sintetišu kateholamine i sadržaj noradrenalina u njima

Za razliku od smanjenja koncentracije noradrenalina koje je detektovano u uzorcima tkiva timusa, u suspenzijama timocita sveže izolovanih iz timusa orhidektomisanih životinja izmereno je značajno ($p < 0.01$) povećanje sadržaja ovog hormona/neurotransmitera (Slika 13). Ovaj nalaz je bio u saglasnosti sa značajnim ($p < 0.01$) porastom relativnog broja ćelija koje sadrže TH, u suspenzijama ćelija izolovanih iz timusa orhidektomisanih životinja, i značajnim ($p < 0.01$) povećanjem prosečne gustine ekspresije TH u ovim ćelijama, sudeći prema srednjem intenzitetu fluorescentnog signala koji emituje FITC vezan za antitela protiv TH kojima su ćelije obeležene (Slika 13).

U saglasnosti sa prethodno navedenim nalazima, pokazano je i značajno ($p < 0.05$) povećanje sadržaja iRNK za TH u suspenzijama timocita orhidektomisanih životinja, dok je, sa druge strane, u istim suspenzijama ćelija izmerena značajno ($p < 0.05$) manja ekspresija gena za DBH. Pored toga, u suspenzijama timocita orhidektomisanih pacova, pokazana je i značajno ($p < 0.05$) manja ekspresija gena za MAO-A (Slika 13).

4.3.1.3. Uticaj orhidektomije na gustinu ćelija strome timusa koje sadrže kateholamine i sadržaj kateholamina u njima

Indukcijom tkivne fluorescence upotrebom SPG rastvora, na presecima tkiva timusa orhidektomisanih i lažno orhidektomisanih kontrolnih pacova, nađeno je da orhidektomija dovodi i do značajnog ($p < 0.05$) smanjenja gustine velikih autofluorescentnih ćelija koje sadrže kateholamine i intenziteta fluorescentnog signala koji ove ćelije emituju (Slika 12).



Slika 13. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na sadržaj noradrenalina i ekspresiju enzima uključenih u sintezu i degradaciju katecholamina u timocitima odraslih pacova.

A. Hromatogrami reprezentativnih uzoraka timocita koji su sveže izolovani iz timusa (linija 1) orhidektomisanih (ORH) i (linija 2) lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova, kao i (linija 3) smeše standarda sačinjene od 10 ng/ml noradrenalina (NA) i 10 ng/ml adrenalina (A) u 0.4 M perhlornoj kiselini. Strelice označavaju pikove koji odgovaraju NA i A.

B. Histogram prikazuje sadržaj NA u timocitima ORH i kontrolnih pacova.

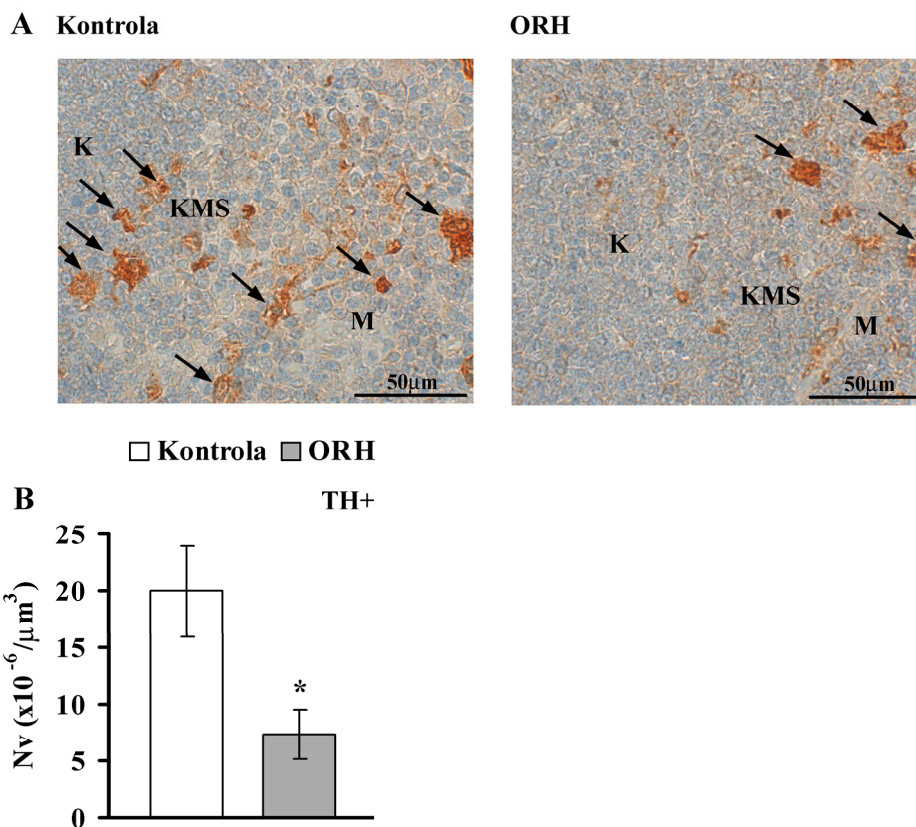
C. Protočno citofluorimetrijski histogrami prikazuju ekspresiju tirozin hidrosilaze (TH) u reprezentativnim uzorcima timocita ORH (crna linija) i kontrolnih (siva linija) pacova. Isprekidana linija predstavlja izotipsku kontrolu.

D. Histogrami prikazuju (a) procenat timocita koji sadrže TH (TH+) i (b) srednji intenzitet fluorescencije (engl. mean fluorescence intensity, MFI) koju emituje FITC vezan za antitelo protiv TH, kojim su obeleženi timociti ORH i kontrolnih pacova.

E. Histogram prikazuje sadržaj iRNK za TH, dopamin- β -hidrosilazu (DBH) i monoamino-oksidadu-A (MAO-A) u timocitima ORH i kontrolnih pacova.

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

Nalaz smanjene gustine velikih ćelija strome timusa koje emituju fluorescentni signal bio je u potpunom skladu sa značajnim ($p < 0.05$) smanjenjem numeričke gustine TH⁺ ćelija strome u timusu orhidektomisanih pacova, u poređenju sa lažno orhidektomisanim kontrolnim životinjama (Slika 14).



Slika 14. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na gustinu ćelija strome koje ekspimiraju tirozin hidroksilazu u timusu odraslih pacova.

A. Reprezentativne fotomikrografije prikazuju imunocitohemijsko bojenje tkiva timusa (desno) orhidektomisanih (ORH) i (levo) lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova, korišćenjem antitela protiv tirozin hidroksilaze (TH). Strelice označavaju ćelije strome timusa koje sadrže TH (TH⁺). K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica; M, medula. Originalno uveličanje, x40.

B. Histogram prikazuje numeričku gustinu (Nv) TH⁺ ćelija strome timusa ORH i kontrolnih životinja.

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

4.3.2. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu

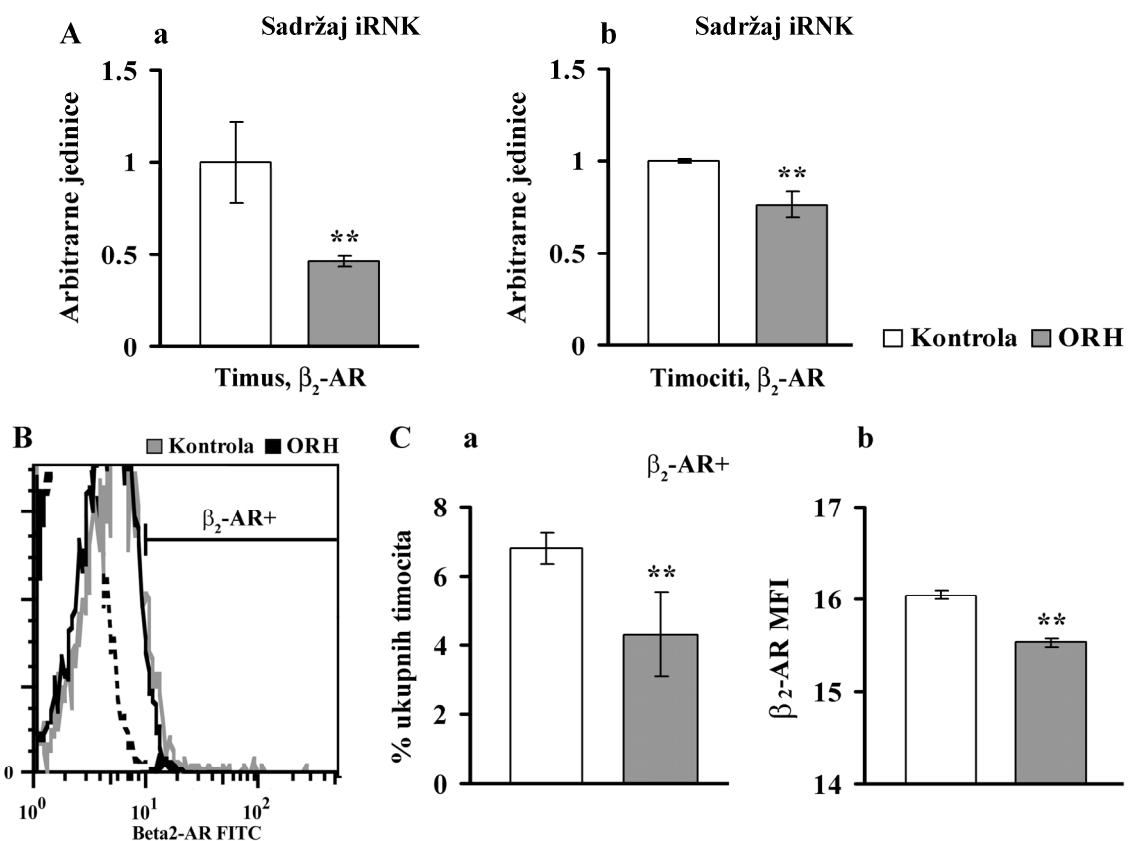
S obzirom na to da su studije različitih istraživačkih grupa ukazale na korelaciju između koncentracije polnih hormona u cirkulaciji i ispoljavanja adrenergičkih receptora (Marchetti i sar., 1990b; 1994), te da se β_2 -adrenergički receptor smatra ključnim u kateholaminergičkoj regulaciji imunskog sistema (Kohm i Sanders, 2001), naredna faza istraživanja bila je posvećena ispitivanju efekata uklanjanja testisa, kao glavnog izvora muških polnih hormona, na ispoljavanje ovog receptora u timusu.

Orhidektomija pacova u uzrastu od 30 dana dovela je do statistički značajnog ($p < 0.01$) smanjenja sadržaja iRNK koja kodira β_2 -adrenergički receptor u timusu, u poređenju sa lažno operisanim kontrolnim životinjama (Slika 15). S obzirom na to da je ispoljavanje β_2 -adrenergičkih receptora pokazano kako na timocitima, tako i na nelimfoidnim ćelijama timusa, postavilo se pitanje da li orhidektomija ima isti efekat na oba tipa ćelija.

4.3.2.1. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timocitima

Uklanjanje testisa pacovima u uzrastu od 30 dana dovelo je do značajnog ($p < 0.01$) smanjenja ekspresije iRNK za β_2 -adrenergički receptor u timocitima, u odnosu na kontrolne životinje (Slika 15). Pored toga, orhidektomija je dovela i do značajnog ($p < 0.01$) smanjenja prosečnog ispoljavanja odgovarajućeg proteina po ćeliji, sudeći prema srednjem intenzitetu fluorescence koju emituje FITC vezan za antitela koja se vezuju za β_2 -adrenergički receptor (Slika 15).

Pored smanjenja prosečnog ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora po ćeliji, uočeno je i značajano ($p < 0.01$) smanjenje procenta ćelija koje ispoljavaju ovaj receptor u suspenzijama timocita (Slika 15), što je takođe doprinelo smanjenju ukupne količine iRNK za β_2 -adrenergički receptor u suspenzijama timocita orhidektomisanih pacova.



Slika 15. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu i timocitima odraslih pacova.

A. Histogrami prikazuju sadržaj iRNK za β_2 -adrenergički receptor (β_2 -AR) u (a) tkivu timusa i (b) timocitima koji su sveže izolovani iz timusa orhidektomisanih (ORH) i lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova.

B. Protočno citofluorimetrijski histogrami prikazuju ispoljavanje β_2 -AR u reprezentativnim uzorcima timocita ORH (crna linija) i kontrolnih (siva linija) pacova. Isprekidana linija predstavlja izotipsku kontrolu.

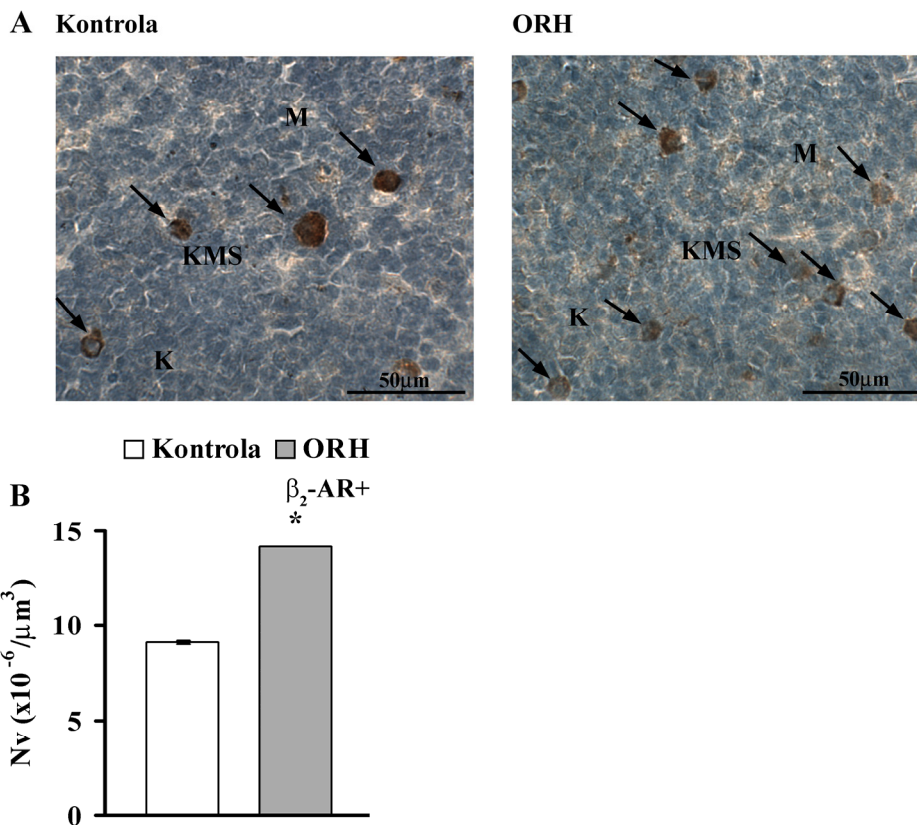
C. Histogrami prikazuju (a) procenat timocita koji ispoljavaju β_2 -AR (β_2 -AR+) i (b) srednji intenzitet fluorescence (engl. mean fluorescence intensity, MFI) koju emituje FITC vezan za antitelo protiv β_2 -AR, kojim su obeleženi timociti ORH i kontrolnih pacova.

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

4.3.2.2. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u ćelijama strome timusa

Uklanjanje testisa 30. postnatalnog dana dovelo je, kod odraslih životinja, do značajnog (p<0.05) povećanja numeričke gustine ćelija strome timusa koje na svojoj membrani ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor (Slika 16). Sa druge strane, imajući u

vidu da je smanjenje ekspresije odgovarajuće iRNK u timusnom tkivu (približno za 55%) bilo znatno izraženije u odnosu na smanjenje nivoa iRNK u timocitima (približno za 24%), moguće je pretpostaviti da je povećanje gustine ćelija strome timusa koje na membrani ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor bilo praćeno smanjenjem ekspresije iRNK za β_2 -adrenergički receptor po ćeliji.



Slika 16. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na gustinu ćelija strome koje ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor u timusu odraslih pacova.

A. Reprezentativne fotomikrografije prikazuju imunocitohemijsko bojenje tkiva timusa (desno) orhidektomisanih (ORH) i (levo) lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova, korišćenjem antitela protiv β_2 -adrenergičkog receptora (β_2 -AR). Strelice označavaju ćelije strome timusa koje ispoljavaju β_2 -AR (β_2 -AR+).

K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica; M, medula. Originalno uveličanje, x40.

B. Histogram prikazuje numeričku gustinu (Nv) β_2 -AR+ ćelija strome timusa ORH i kontrolnih životinja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. (n=6). * p<0.05.

Svi podaci izloženi u ovom poglavlju ukazuju da orhidektomija u kasnom prepubertenom uzrastu dovodi do smanjenja koncentracije noradrenalina u timusu, kao i do smanjenja ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora u ovom organu, kod mladih odraslih životinja. Ovi nalazi sugerišu promenu efikasnosti modulacionog delovanja

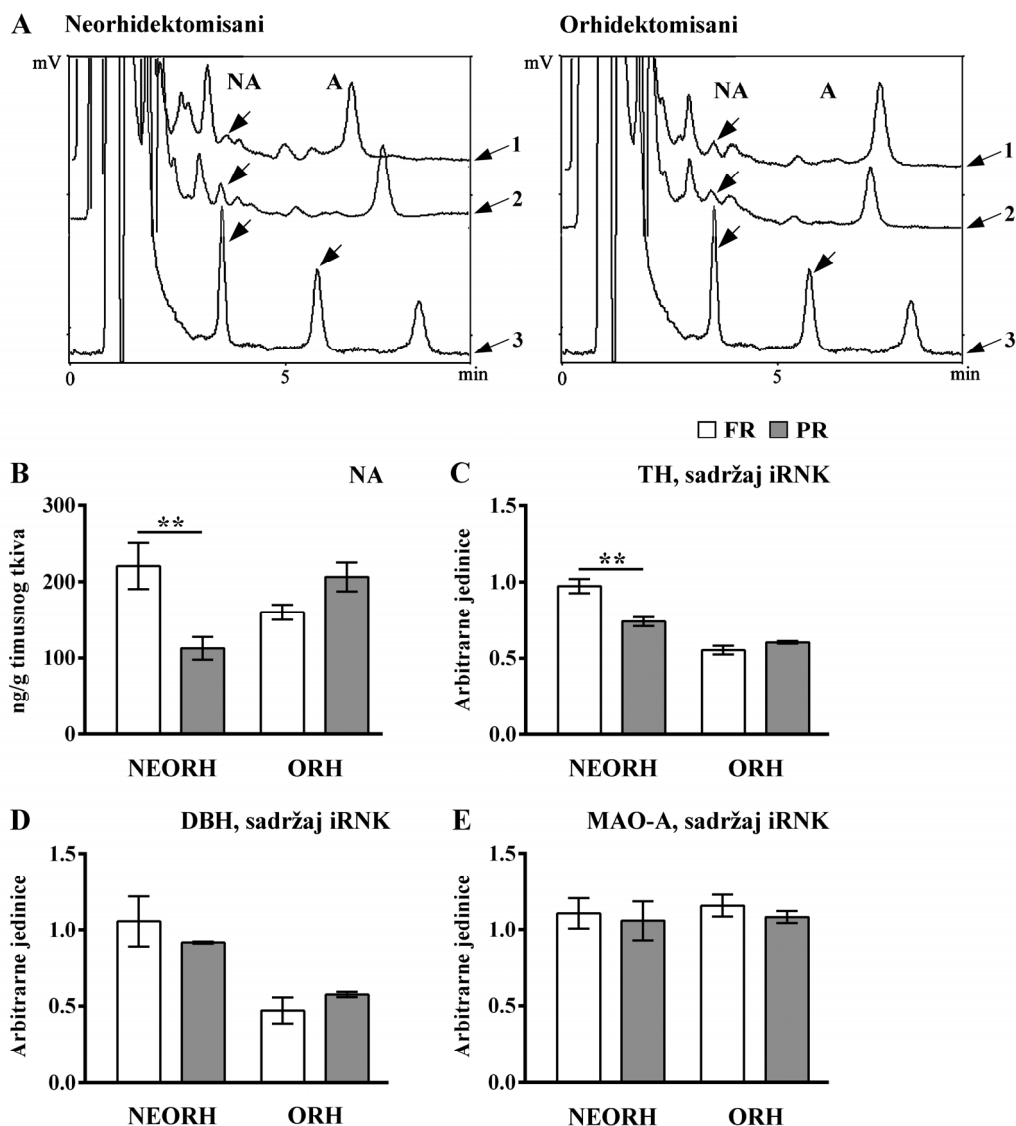
signalnog kompleksa sačinjenog od noradrenalina i β_2 -adrenergičkog receptora na proces timopoeze, u odsustvu hormona testisa. Da bi se ova mogućnost ispitala, analizirani su efekti dugotrajnog tretmana antagonistom β -adrenergičkih receptora propranololom na diferencijaciju/sazrevanje timocita kod odraslih pacova neorhidektomisanih i orhidektomisanih u uzrastu od 30 dana. Ovom delu istraživanja je prethodilo ispitivanje efekata samog tretmana propranololom na koncentraciju noradrenalina i ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu odraslih pacova.

4.4. UTICAJ DUGOTRAJNOG TRETMANA PROPRANOLOLOM NA KONCENTRACIJU KATEHOLAMINA I ISPOLJAVANJE β_2 -ADRENERGIČKOG RECEPTORA U TIMUSU U PRISUSTVU I ODSUSTVU HORMONA TESTISA

4.4.1. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na koncentraciju noradrenalina u timusu

Dugotrajan tretman propranololom doveo je do značajnog ($p < 0.01$) smanjenja koncentracije noradrenalina u timusu neorhidektomisanih pacova. Merenje ekspresije gena značajnih za sintezu i degradaciju kateholamina je pokazalo da u tkivu timusa ovih pacova dolazi do značajnog ($p < 0.01$) smanjenja ekspresije iRNK koja kodira TH (Slika 17). Kako tretman propranololom nije doveo do značajnih promena u ekspresiji gena koji kodiraju DBH i MAO-A (Slika 17), delovanje propranolola na koncentraciju noradrenalina u timusu se može, pre svega, povezati sa smanjenjem ekspresije TH.

Hronično davanje propranolola je uticalo na koncentraciju noradrenalina i ekspresiju gena za TH u timusu samo kod neorhidektomisanih životinja, pa je dvofaktorska analiza varijanse pokazala postojanje značajnih orhidektomija x propranolol interakcija [koncentracija noradrenalina: $F(1,20)=13.2$, $p=0.0019$; ekspresija gena za TH: $F(1,20)=15.9$, $p=0.0032$]. Tretman propranololom nije uticao na ekspresiju gena za DBH i MAO-A, ni u prisustvu, ni u odsustvu hormona testisa (Slika 17).



Slika 17. Uticaj četrnaestodnevnog tretmana propranololom na koncentraciju noradrenalina i ekspresiju gena za enzime uključene u sintezu i degradaciju kateholamina u timusu neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A. Hromatogrami reprezentativnih uzoraka tkiva timusa koje je sveže izolovano nakon (linija 1) tretmana propranololom (PR) ili (linija 2) fiziološkim rastvorom (FR) odraslih mužjaka pacova, (levo) neorhidektomisanih (NEORH) i (desno) orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, kao i (linija 3) smeše standarda sačinjene od 25 ng/ml noradrenalina (NA) i 25 ng/ml adrenalina (A) u 0.4 M perhlornoj kiselini. Streljice označavaju pikove koji odgovaraju NA i A.

B. Histogram prikazuje koncentraciju NA u tkivu timusa NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

C, D, E. Histogrami prikazuju sadržaj iRNK za **(C)** tirozin hidroksilazu (TH), **(D)** dopamin-β-hidroksilazu (DBH) i **(E)** monoamino-oksidadazu-A (MAO-A) u tkivu timusa NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. (n=6). ** p<0.01.

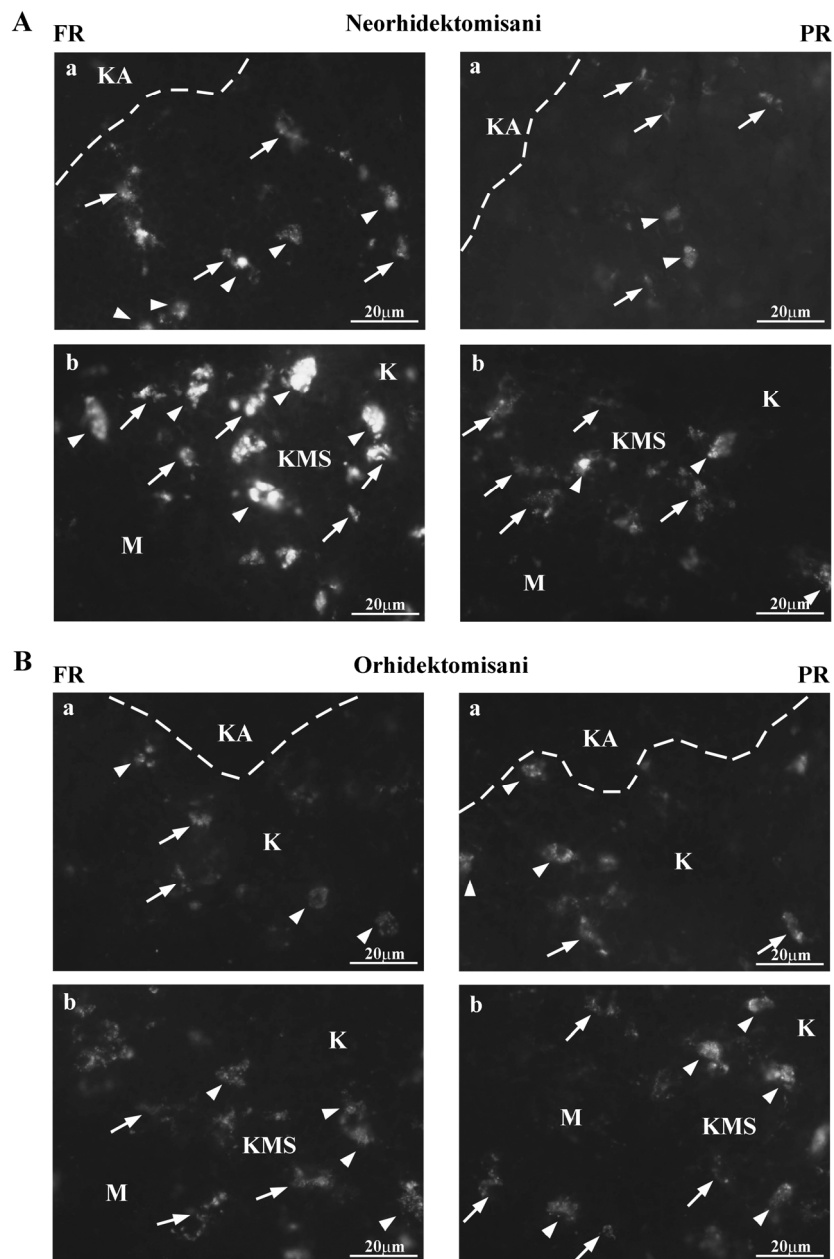
4.4.1.1. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na gustinu simpatičkih nervnih vlakana u timusu i sadržaj kateholamina u njima

Davanje propranolola je dovelo do značajnog ($p < 0.05$) smanjenja intenziteta fluorescence autofluorescentnih nervnih vlakana, kao mere sadržaja kateholamina, najverovatnije noradrenalina, u njima, ali nije imalo uticaja na njihovu gustinu, u timusu neorhidektomisanih pacova (Slika 18, 19).

Kod orhidektomisanih pacova, efekat tretmana propranololom na sadržaj noradrenalina u autofluorescentnim nervnim vlaknima, sudeći prema intenzitetu fluorescentnog signala, je izostao [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=11.33$, $p=0.0037$], dok se gustina vlakana nije menjala ni u odsustvu polnih hormona, kao ni u njihovom prisustvu (Slika 19).

4.4.1.2. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na procentualnu zastupljenost timocita koji sintetišu kateholamine i sadržaj noradrenalina u njima

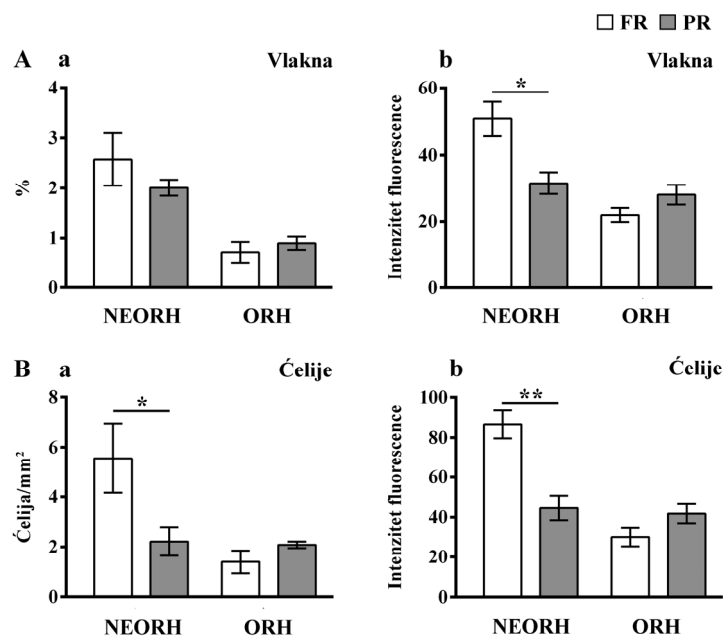
U poređenju sa neorhidektomisanim pacovima tretiranim fiziološkim rastvorom, u timocitima životinja koje su podvrgnute tretmanu propranololom nije došlo do značajne promene u sadržaju noradrenalina, kao ni u nivou ekspresije gena uključenih u sintezu i degradaciju kateholamina (Slika 20). Analiza ekspresije proteina protočnom citofluorimetrijom je pokazala da se procentualna zastupljenost timocita koji ekspimiraju TH značajno ($p < 0.01$) povećava, dok se sadržaj enzima po ćeliji (sudeći prema srednjem intenzitetu fluorescentnog signala koji potiče od ćelija koje vezuju anti-TH antitela za koja je vezan FITC) u ovoj subpopulaciji ćelija istovremeno smanjuje ($p < 0.01$) (Slika 20), usled delovanja propranolola, što objašnjava odsustvo promene na nivou ekspresije odgovarajućeg gena.



Slika 18. Analiza uticaja četrnaestodnevnog tretmana propranololom na gustinu nervnih vlakana i ćelija strome koje sadrže kateholamine i sadržaj kateholamina u njima u timusu neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A, B. Reprezentativne fotomikrografije preseka tkiva timusa tretiranih rastvorom saharoza-fosfatglikosalna kiselina (SPG) prikazuju fluorescentna nervna vlakna (strelice) i ćelije (vrhovi strelica) u **(a)** korteksu i **(b)** kortiko-medularnoj spojnici i meduli odraslih mužjaka pacova **(A)** neorhidektomisanih i **(B)** orhidektomisanih u uzrastu od 30 dana, tretiranih (desno) propranololom (PR) ili (levo) fiziološkim rastvorom (FR). Isprekidana linija prikazuje granicu između kapsule i korteksa timusa.

KA, kapsula; K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica; M, medula. Originalno uveličanje, x40.



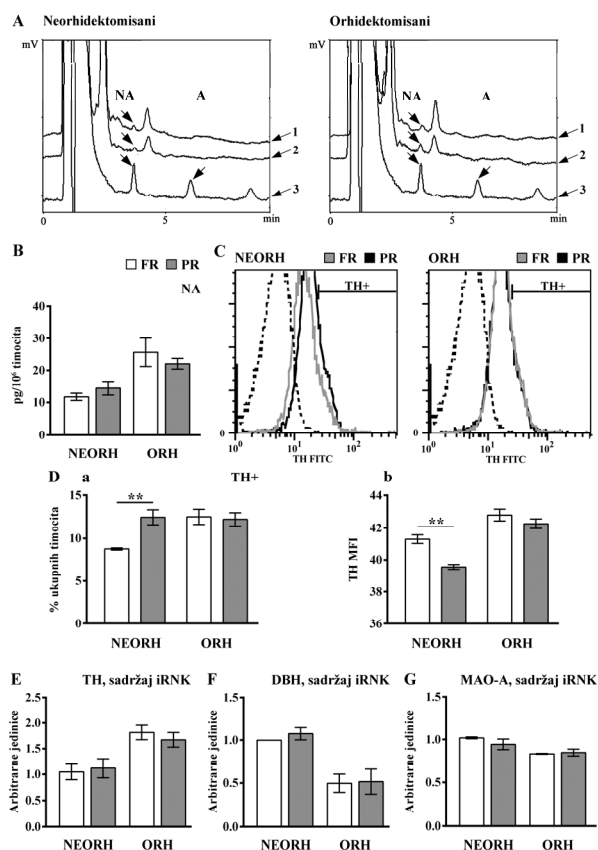
Slika 19. Uticaj četrnaestodnevnog tretmana propranololom na gustinu nervnih vlakana i ćelija strome koje sadrže katecholamine i sadržaj katecholamina u njima u timusu neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A. Histogrami prikazuju (a) gustinu (procenat površine testnog polja koji zauzimaju nervna vlakna) i (b) intenzitet emitovanog fluorescentnog signala nervnih vlakana u timusu odraslih mužjaka pacova neorhidektomisanih (NEORH) i orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR).

B. Histogrami prikazuju (a) gustinu (broj ćelija/mm²) i (b) intenzitet emitovanog fluorescentnog signala ćelija strome timusa NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

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

Kao i u slučaju neorhidektomisanih životinja, tretman propranololom nije značajno uticao ni na sadržaj noradrenalina, ni na sadržaj iRNK za enzime uključene u sintezu i degradaciju katecholamina, u timocitima orhidektomisanih životinja (Slika 20), pa dvofaktorska analiza varijanse nije pokazala značajne orhidektomija x propranolol interakcije. Sa druge strane, tretman propranololom je na procentualnu zastupljenost TH⁺ timocita [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=7.58$, $p=0.0131$] i na prosečnu ekspresiju TH po timocitu (sudeći prema prosečnom intenzitetu fluorescentnog signala koji emituje FITC vezan za antitela protiv TH vezana za ovaj enzim u timocitima) [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=4.54$, $p=0.0456$] uticao samo kod neorhidektomisanih životinja (Slika 20).



Slika 20. Uticaj četrnaestodnevnog tretmana propranololom na sadržaj noradrenalina i ekspresiju enzima uključenih u sintezu i degradaciju kateholamina u timocitima neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A. Hromatogrami reprezentativnih uzoraka timocita koji su sveže izolovani nakon (linija 1) tretmana propranololom (PR) ili (linija 2) fiziološkim rastvorom (FR) odraslih mužjaka pacova (levo) neorhidektomisanih (NEORH) i (desno) orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, kao i (linija 3) smeše standarda sačinjene od 10 ng/ml noradrenalina (NA) i 10 ng/ml adrenalina (A) u 0.4 M perhlornoj kiselini. Strelice označavaju pikove koji odgovaraju NA i A.

B. Histogram prikazuje sadržaj NA u timocitima NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

C. Protočno citofluorimetrijski histogrami prikazuju ekspresiju tirozin hidroksilaze (TH) u reprezentativnim uzorcima timocita (levo) NEORH i (desno) ORH pacova, koji su primali PR (crna linija) ili FR (siva linija). Isprekidana linija predstavlja izotipsku kontrolu.

D. Histogrami prikazuju **(a)** procenat timocita koji sadrže TH (TH+) i **(b)** srednji intenzitet fluorescencije (engl. mean fluorescence intensity, MFI) koju emituje FITC vezan za antitelo protiv TH, kojim su obeleženi timociti NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

E, F, G. Histogrami prikazuju sadržaj iRNK za **(E)** TH, **(F)** dopamin- β -hidroksilazu (DBH) i **(G)** monoamino-oksidadazu-A (MAO-A) u timocitima NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

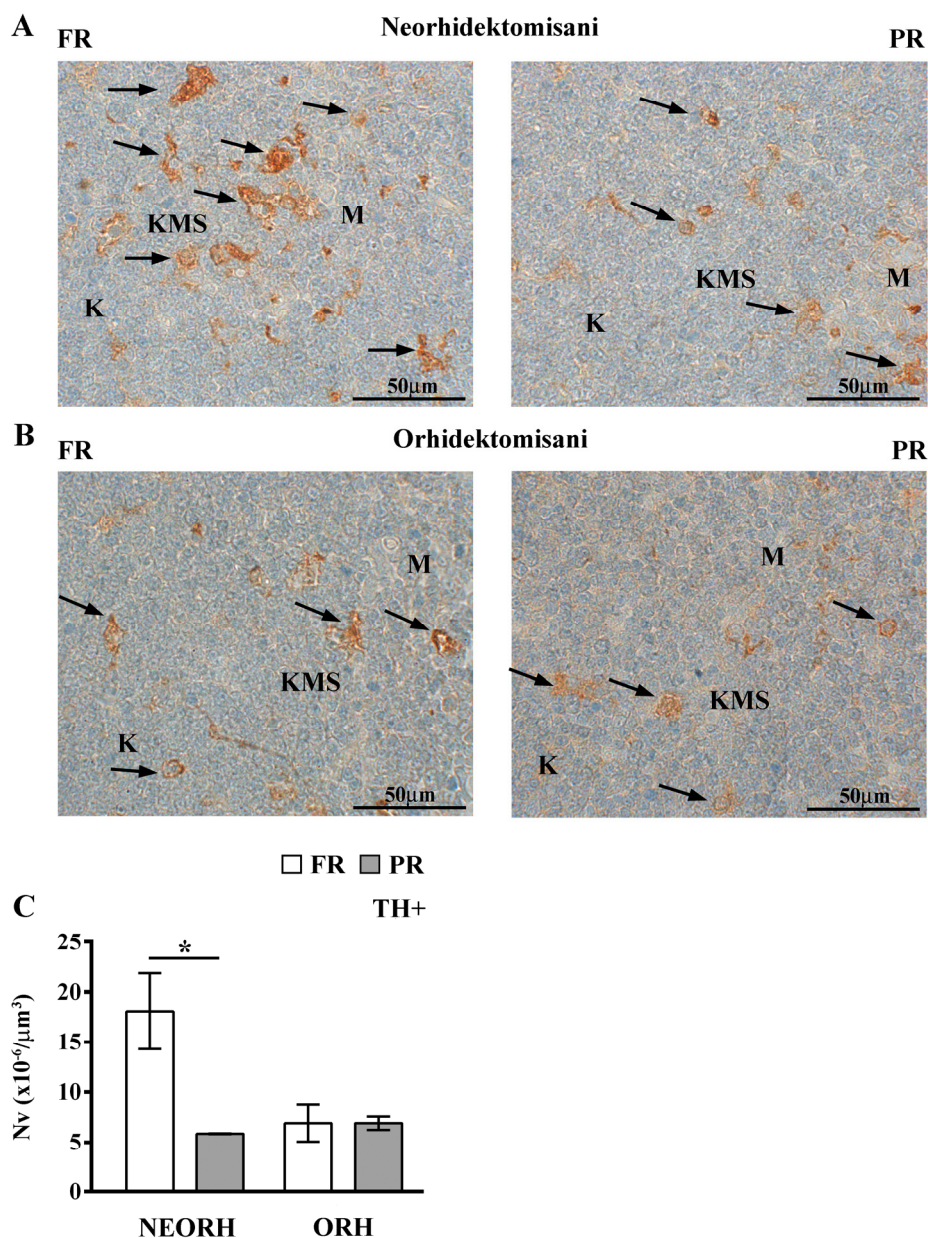
Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. (n=6). ** p<0.01.

4.4.1.3. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na gustinu ćelija strome timusa koje sadrže kateholamine i sadržaj kateholamina u njima

Primenom SPG metode je pokazano da hroničan tretman propranololom dovodi do značajnog ($p < 0.05$) smanjenja gustine velikih ćelija strome koje emituju fluorescentni signal, kao i do značajnog ($p < 0.01$) smanjenja intenziteta ovog signala, u poređenju sa kontrolnim životinjama koje su primale fiziološki rastvor (Slika 18, 19).

U skladu sa prethodnim nalazom, kvantifikacijom TH⁺ ćelija strome, identifikovanih imunocitohemijskom metodom na presecima tkiva timusa, nađeno je statistički značajno ($p < 0.05$) smanjenje numeričke gustine ovih ćelija, u odnosu na pacove odgovarajuće kontrolne grupe (Slika 21).

Za razliku od neorhidektomisanih životinja, u timusu orhidektomisanih pacova tretman propranololom nije ispoljio efekat na gustinu velikih autofluorescentnih ćelija [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=11.67$, $p=0.0033$], niti na intenzitet fluorescentnog signala koji ove ćelije emituju [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=22.52$, $p=0.0001$] (Slika 18, 19), kao ni na numeričku gustinu TH⁺ ćelija strome [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=8.18$, $p=0.0097$] (Slika 21).



Slika 21. Uticaj četrnaestodnevnog tretmana propranololom na gustinu ćelija strome koje ekspimiraju tirozin hidroksilazu u timusu neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A, B. Reprezentativne fotomikrografije prikazuju imunocitohemijsko bojenje tkiva timusa odraslih mužjaka pacova **(A)** neorhidektomisanih (NEORH) i **(B)** orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih (desno) propranololom (PR) ili (levo) fiziološkim rastvorom (FR), korišćenjem antitela protiv tirozin hidroksilaze (TH). Strelice označavaju ćelije strome timusa koje sadrže TH (TH+).

K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica; M, medula. Originalno uveličanje, x40.

C. Histogram prikazuje numeričku gustinu (Nv) TH+ ćelija strome timusa NEORH i ORH životinja, koje su primale PR ili FR.

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

4.4.2. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu

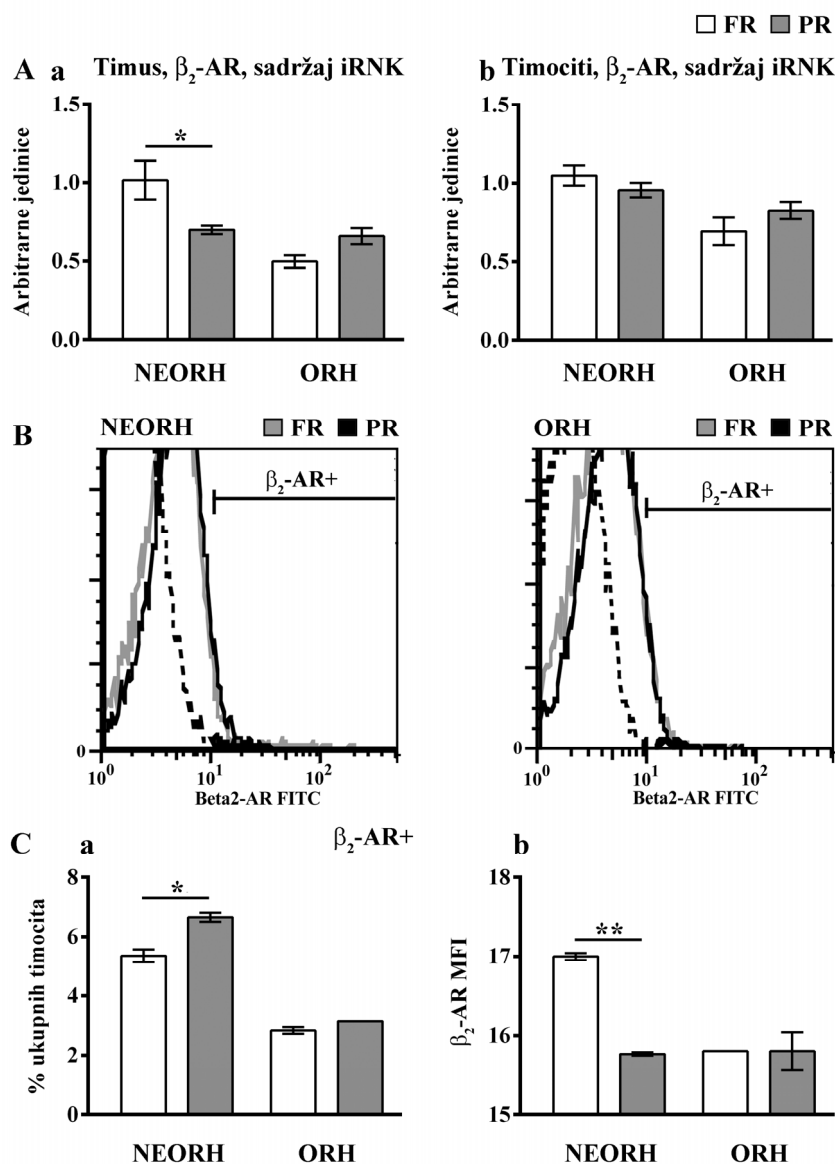
U poređenju sa kontrolnim životinjama tretiranim fiziološkim rastvorom, u timusu pacova koji su tretirani propranololom, u prisustvu hormona testisa, nađena je značajno ($p < 0.05$) manja ekspresija gena koji kodira β_2 -adrenergički receptor (Slika 22).

Sa druge strane, dugotrajan tretman propranololom, u uslovima nedostatka muških polnih steroida, nije uzrokovao značajnu promenu ekspresije gena koji kodira β_2 -adrenergički receptor u timusu pacova, u poređenju sa operisanim životinjama tretiranim fiziološkim rastvorom, tako da je dvofaktorska analiza varijanse pokazala značajnu interakciju orhidektomije i tretmana propranololom [$F(1,20)=10.2$, $p=0.0086$] (Slika 22).

4.4.2.1. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timocitima

U sveže izolovanim timocitima neorhidektomisanih pacova koji su tretirani propranololom, sadržaj iRNK za β_2 -adrenergički receptor je ostao nepromenjen u odnosu na kontrolne životinje tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 22). Ovakav nalaz se može povezati sa rezultatima protočno citofluorimetrijske analize, koji su pokazali značajno ($p < 0.05$) povećanje relativnog broja ćelija koje ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor, praćeno značajnim ($p < 0.01$) smanjenjem površinske gustine receptora po ćeliji (sudeći prema prosečnom intenzitetu fluorescentnog signala koji emituje FITC kojim su obeležena antitela protiv β_2 -adrenergičkog receptora, vezana za ovaj receptor u timocitima), u odgovoru na dugotrajno davanje propranolola (Slika 22).

Davanje propranolola nije pokazalo drugačiji efekat na ekspresiju iRNK za β_2 -adrenergički receptor u timocitima orhidektomisanih pacova, u odnosu na neorhidektomisane životinje (Slika 22). Za razliku od neorhidektomisanih pacova, efekat propranolola na procentualnu zastupljenost ćelija koje ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor u suspenzijama timocita nije uočen kod orhidektomisanih životinja, a dvofaktorska analiza varijanse je pokazala značajnu orhidektomija x propranolol interakciju [$F(1,20)=7.23$, $p=0.0168$] (Slika 22). Slično, tretman propranololom je na površinsku gustinu β_2 -adrenergičkog receptora na membrani timocita uticao samo kod neorhidektomisanih pacova [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=5.34$, $p=0.0329$] (Slika 22).



Slika 22. Uticaj četrnaestodnevnog tretmana propranololom na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu i timocitima neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A. Histogrami prikazuju sadržaj iRNK za β_2 -adrenergički receptor (β_2 -AR) u **(a)** tkivu timusa i **(b)** timocitima koji su sveže izolovani iz timusa odraslih mužjaka pacova neorhidektomisanih (NEORH) i orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR).

B. Protočno citofluorimetrijski histogrami prikazuju ispoljavanje β_2 -AR u reprezentativnim uzorcima timocita (levo) NEORH i (desno) ORH pacova, koji su primali PR (crna linija) ili FR (siva linija). Isprekidana linija predstavlja izotipsku kontrolu.

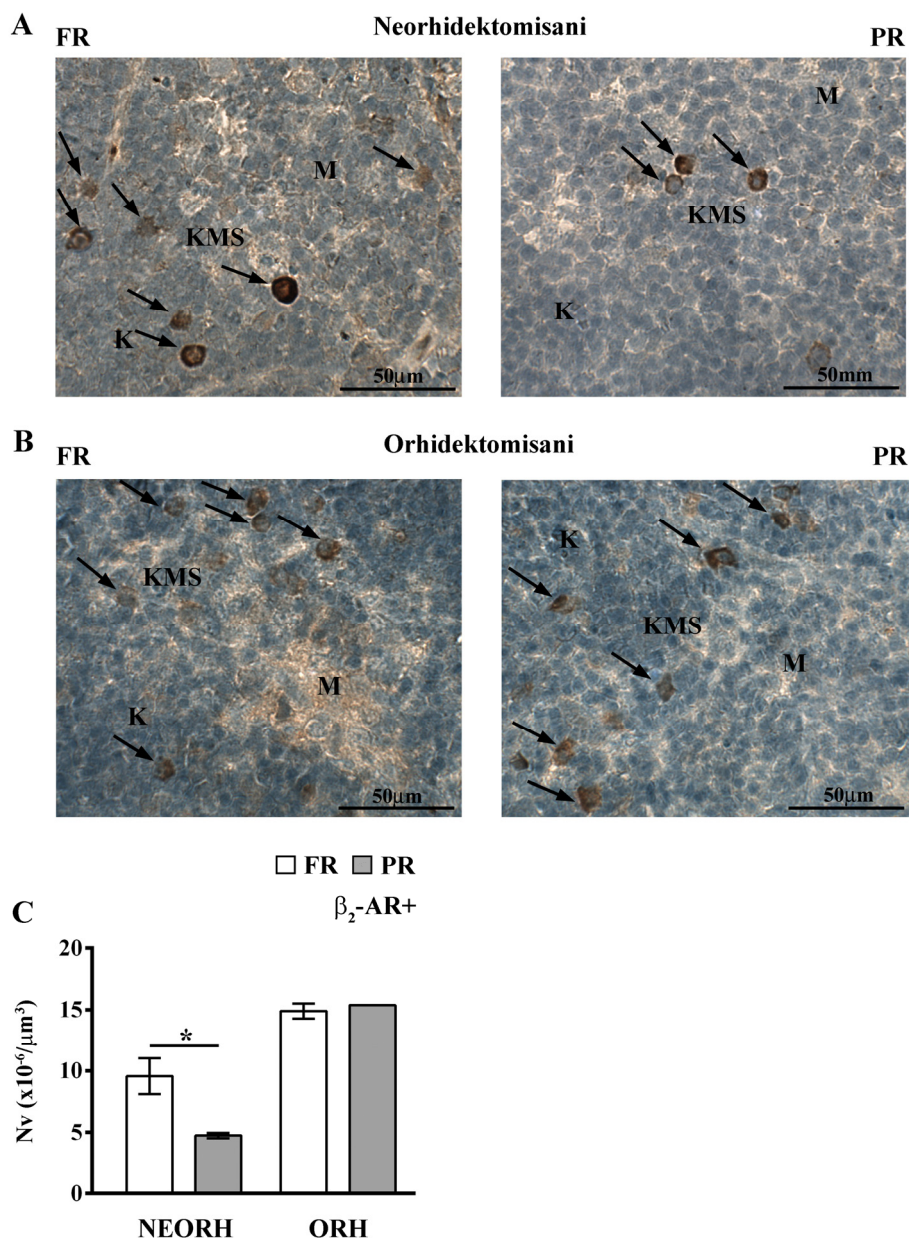
C. Histogrami prikazuju **(a)** procenat timocita koji ispoljavaju β_2 -AR (β_2 -AR+) i **(b)** srednji intenzitet fluorescence (engl. mean fluorescence intensity, MFI) koju emituje FITC vezan za antitelo protiv β_2 -AR, kojim su obeleženi timociti NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

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

4.4.2.2. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u ćelijama strome timusa

Imunocitohemijskim bojenjem i kvantifikacijom ćelija strome timusa koje ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor utvrđeno je da je, u prisustvu hormona testisa, numerička gustina ovih ćelija u timusu pacova koji su tretirani propranololom statistički značajno ($p < 0.05$) manja u odnosu na kontrolne životinje koje su primale fiziološki rastvor (Slika 23). Kako je smanjenje sadržaja iRNK koja kodira β_2 -adrenergički receptor u timusu manje izraženo (približno za 30%), u odnosu na smanjenje numeričke gustine ćelija koje ispoljavaju sam receptor (približno za 50%), moguće je pretpostaviti da se ekspresija iRNK za β_2 -adrenergički receptor po ćeliji strome timusa povećava, u odgovoru na dugotrajno davanje propranolola, u prisustvu hormona testisa.

Kako kod orhidektomisanih životinja davanje propranolola nije uticalo na numeričku gustinu ćelija strome timusa koje ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor, utvrđena je značajna interakcija između orhidektomije i tretmana propranololom [$F(1,20)=9.67$, $p=0.0083$] (Slika 23). U kontekstu nepromenjenog nivoa odgovarajuće iRNK u timusu i nepromenjenog nivoa ekspresije u timocitnoj populaciji, dobijeni podatak ukazuje da tretman propranololom nije uticao na ekspresiju iRNK koja kodira β_2 -adrenergički receptor na nivou pojedinačne ćelije strome, u odsustvu hormona testisa.



Slika 23. Uticaj četrnaestodnevnog tretmana propranololom na gustinu ćelija strome koje ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor u timusu neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A, B. Reprezentativne fotomikrografije prikazuju imunocitohemijsko bojenje tkiva timusa odraslih mužjaka pacova (**A**) neorhidektomisanih (NEORH) i (**B**) orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih (desno) propranololom (PR) ili (levo) fiziološkim rastvorom (FR), korišćenjem antitela protiv β_2 -adrenergičkog receptora (β_2 -AR). Strelice označavaju ćelije strome timusa koje ispoljavaju β_2 -AR (β_2 -AR+).

K, korteks; KMS, kortiko-medularna spojnica; M, medula. Originalno uveličanje, x40.

C. Histogram prikazuje numeričku gustinu (Nv) β_2 -AR+ ćelija strome timusa NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

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

4.5. UTICAJ ORHIDEKTOMIJE NA DIFERENCIJACIJU/SAZREVANJE TIMOCITA U TIMUSU ODRASLIH PACOVA

U drugom delu istraživanja, ispitivan je uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na diferencijaciju/sazrevanje timocita kod orhidektomisanih i neorhidektomisanih pacova. Ovaj deo istraživanja je započet ispitivanjem uticaja same orhidektomije na proces diferencijacije/sazrevanja timocita.

4.5.1. Uticaj orhidektomije na ukupan broj timocita i masu timusa

U skladu sa prethodnim nalazima (Leposavić i sar., 1996), kod mužjaka pacova orhidektomisanih 30. postnatalnog dana izmereno je značajno ($p < 0.01$) povećanje ukupnog broja timocita i mase timusa, u poređenju sa lažno orhidektomisanim kontrolnim životinjama. Pored toga, pokazalo se da kastracija dovodi i do značajnog ($p < 0.01$) povećanja kako relativnog broja timocita (broj timocita izražen u odnosu na 100 g telesne mase), tako i relativne mase timusa (masa organa izražena u odnosu na 100 g telesne mase) (Tabela 1).

Tabela 1. Vrednosti apsolutne i relativne mase timusa i apsolutnog i relativnog broja timocita kod odraslih pacova orhidektomisanih (ORH) i lažno orhidektomisanih (Kontrola) u uzrastu od 30 dana.

	Masa timusa (g)	Relativna masa timusa (g/100 g telesne mase)	Broj timocita ($\times 10^7$)	Relativan broj timocita ($\times 10^7/100$ g telesne mase)
Kontrola	0.39 \pm 0.02	0.16 \pm 0.006	27.27 \pm 1.13	10.86 \pm 0.43
ORH	0.82 \pm 0.04 **	0.3 \pm 0.01 **	88.62 \pm 4.66 **	32.49 \pm 1.41 **

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

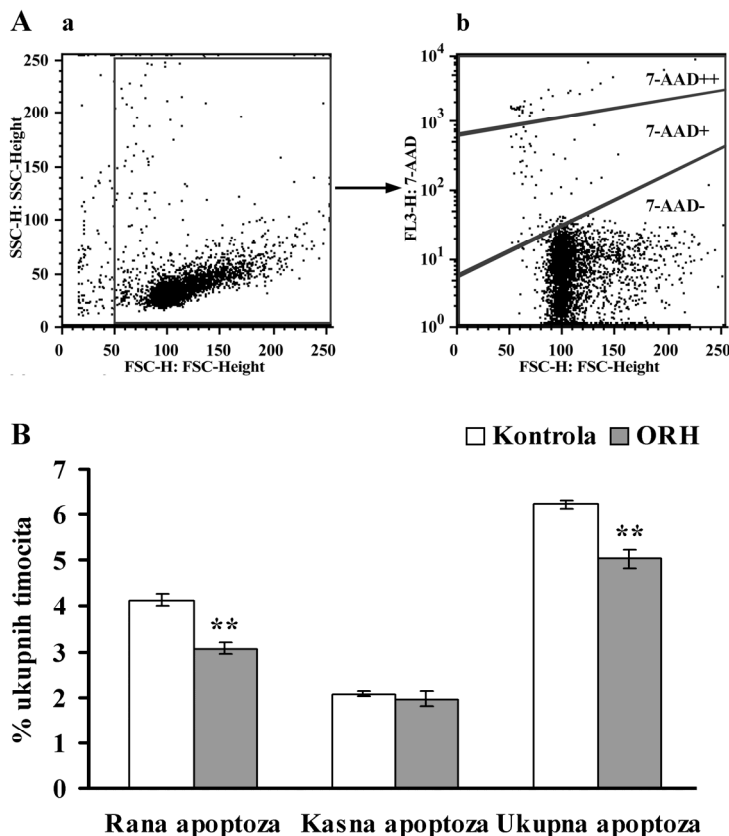
4.5.2. Uticaj orhidektomije na apoptozu i proliferaciju timocita

Imajući u vidu da apoptoza i proliferacija predominantno određuju broj timocita (Pazirandeh i sar., 2005), kao i da androgeni utiču na oba ova procesa (Olsen i sar., 1994; Guevara Patiño i sar., 2000), u suspenzijama sveže izolovanih timocita orhidektomisanih pacova, određivana je procentualna zastupljenost ćelija u apoptozi, odnosno proliferišućih ćelija – ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (S+G2/M).

4.5.2.1. Uticaj orhidektomije na apoptozu timocita

U suspenzijama sveže izolovanih timocita orhidektomisanih pacova, nađen je značajno ($p < 0.01$) manji procenat ćelija u apoptozi, u poređenju sa lažno operisanim

životinjama. Ovaj nalaz je odražavao statistički značajno ($p < 0.01$) smanjenje procenta timocita u ranim fazama apoptoze (Slika 24), budući da orhidektomija nije uticala na procenat ćelija u kasnim fazama apoptoze.



Slika 24. Protočno citofluorimetrijska analiza uticaja orhidektomije u uzrastu od 30 dana na apoptozu sveže izolovanih timocita odraslih pacova.

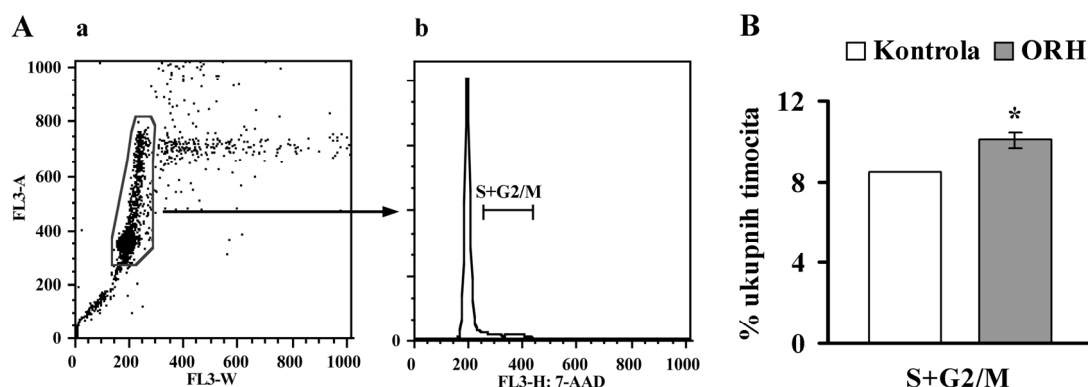
A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikaz (**b**) ilustruje razdvajanje ćelija u ranim i kasnim fazama apoptoze, na osnovu intenziteta fluorescence koju emituje 7-AAD i veličine ćelije (FSC parametar; engl. forward light scatter) u ukupnoj populaciji timocita, koja je izdvojena na osnovu veličine ćelija i njihove gustine (SSC parametar; engl. side light scatter), kao što je ilustrovano na protočno citofluorimetrijskom tačkastom prikazu (**a**). Ćelije u ranoj apoptozi se karakterišu niskim intenzitetom fluorescence koju emituje 7-AAD (7-AAD+) i većim vrednostima FSC parametra, dok se ćelije u kasnoj apoptozi karakterišu visokim intenzitetom fluorescence 7-AAD boje (7-AAD++) i smanjenjem vrednosti FSC parametra.

B. Histogram prikazuje procenat ćelija u ranim i kasnim fazama apoptoze, kao i ukupan procenat ćelija u apoptozi, u suspenzijama timocita orhidektomisanih (ORH) i lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova. Ukupan procenat ćelija u apoptozi dobijen je kao zbir procenata ćelija u ranim i kasnim fazama apoptoze.

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

4.5.2.2. Uticaj orhidektomije na proliferaciju timocita

Procenom procentualne zastupljenosti ćelija u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa u suspenzijama sveže izolovanih timocita orhidektomisanih pacova, odnosno odgovarajućih kontrolnih životinja, pokazano je da hirurško odstranjivanje testisa dovodi po značajnog ($p < 0.05$) povećanja proliferacije timocita (Slika 25).



Slika 25. Protočno citofluorimetrijska analiza uticaja orhidektomije u uzrastu od 30 dana na proliferaciju sveže izolovanih timocita odraslih pacova.

A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski histogram (**b**) ilustruje izdvajanje ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (S+G2/M), na osnovu sadržaja DNK koji je definisan stepenom vezivanja fluorescentne boje 7-AAD, u populaciji živih timocita koja je izdvojena uz upotrebu modula za razdvajanje dubleta (engl. doublet discriminating module), kao što je ilustrovano na protočno citofluorimetrijskom tačkastom prikazu (**a**).

B. Histogram prikazuje procenat ćelija u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa, u suspenzijama timocita orhidektomisanih (ORH) i lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova.

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

4.5.3. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje antigena diferencijacije na membrani timocita

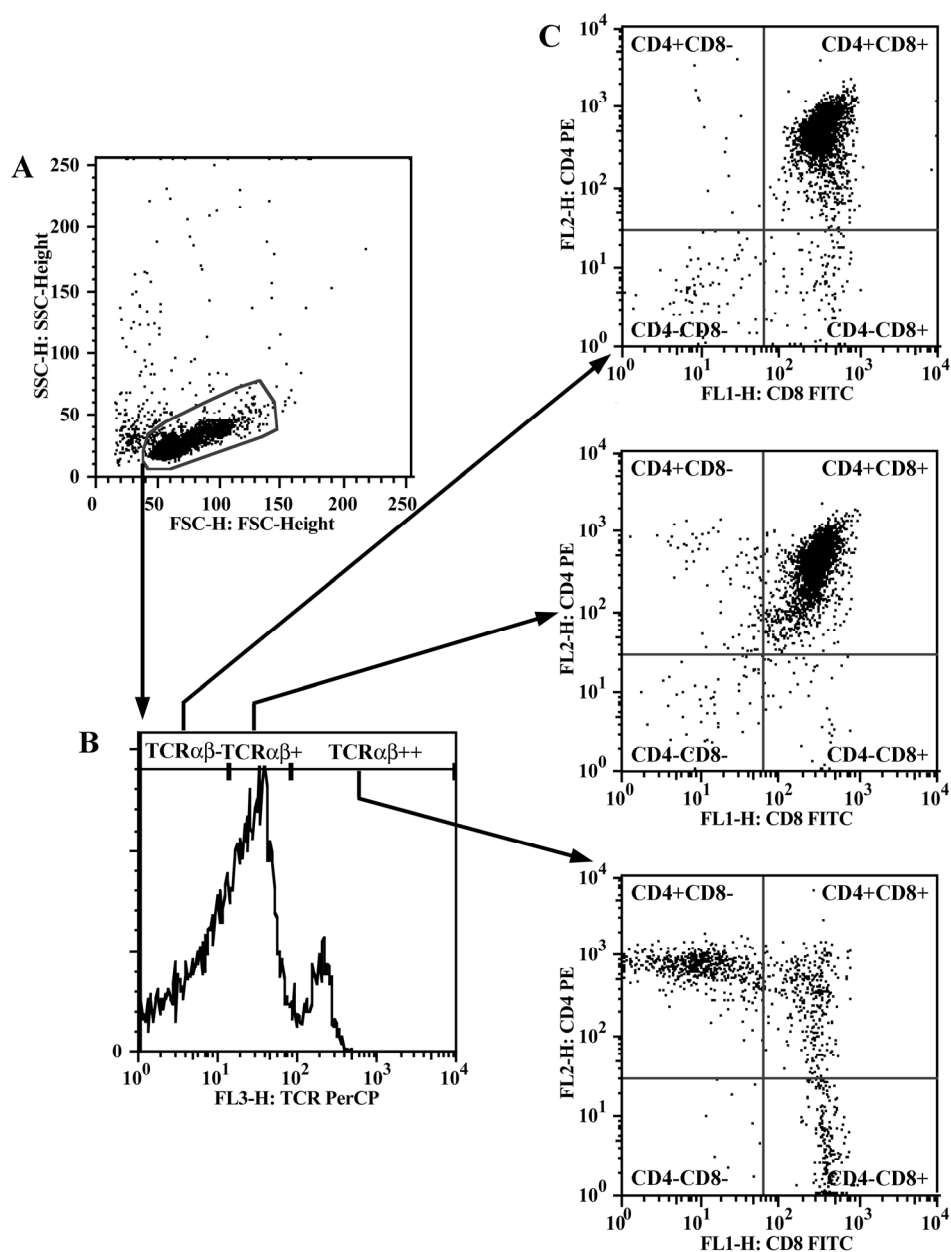
U sledećem koraku, ispitivan je uticaj orhidektomije na sazrevanje/diferencijaciju T-limfocita. Proces diferencijacije/sazrevanja T-ćelija u timusu se odvija kroz niz čvrsto utvrđenih koraka, dobro okarakterisanih na osnovu ispoljavanja tzv. antigena diferencijacije (CD4 i CD8 koreceptor i TCR $\alpha\beta$). Uzimajući u obzir ispoljenost koreceptornih molekula i površinsku gustinu TCR $\alpha\beta$ molekula, koja se može okarakterisati kao nemerljiva (TCR $\alpha\beta$ -), niska (TCR $\alpha\beta$ +) i visoka (TCR $\alpha\beta$ ++),

moguće je, kao što su Tsuchida i saradnici (1994) pokazali, definisati 12 subpopulacija timocita na različitim stadijumima diferencijacije (Slika 26).

4.5.3.1 TCR $\alpha\beta$ - timociti

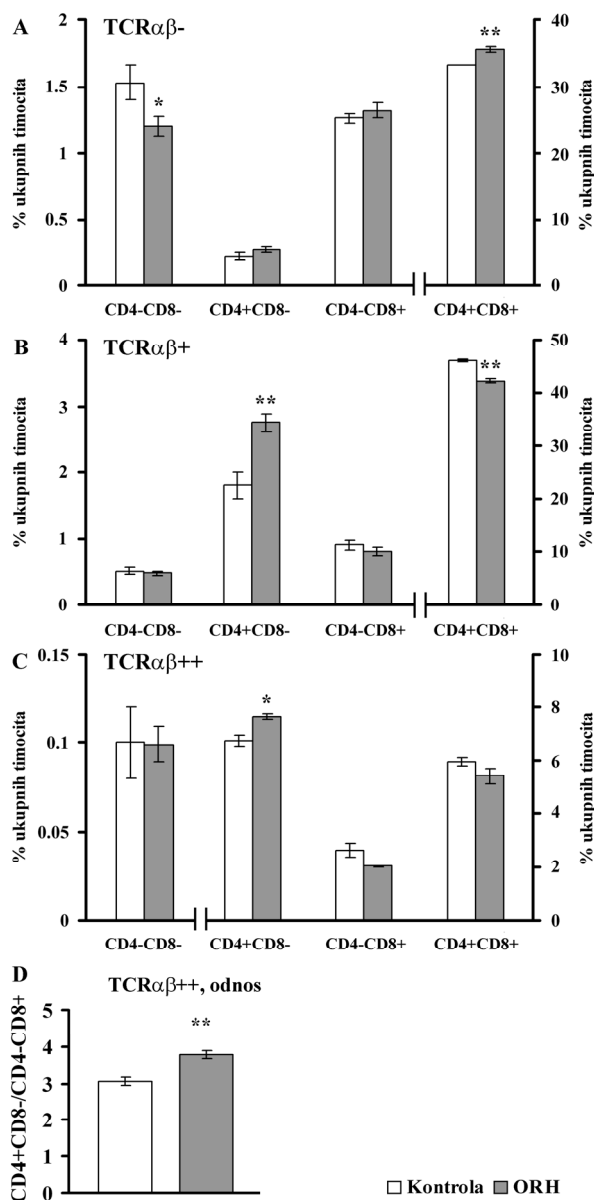
Timocitima koji na svojoj membrani ne ispoljavaju merljivu količinu TCR $\alpha\beta$ pripadaju dve važne subpopulacije ovih ćelija, i to DN TCR $\alpha\beta$ - (koji uključuju progenitorske ćelije koje u timus ulaze iz cirkulacije), i DP TCR $\alpha\beta$ - (ćelije koje su uspešno prošle β -selekciju i na svojoj površini ispoljavaju pre-TCR kompleks, Zamoyska i Lovat, 2004).

Procentualna zastupljenost DN TCR $\alpha\beta$ - timocita bila je statistički značajno ($p < 0.05$) manja u timusu orhidektomisanih pacova, u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 27), dok je procentualna zastupljenost timocita na sledećem DP TCR $\alpha\beta$ - stadijumu razvoja je bila značajno ($p < 0.01$) veća (Slika 27). Veća procentualna zastupljenost DP TCR $\alpha\beta$ - ćelija u timusu orhidektomisanih životinja je sugerisala efikasniju β -selekciju u odsustvu muških polnih hormona. Procentualna zastupljenost CD4+CD8- i CD4-CD8+ JP TCR $\alpha\beta$ - timocita nije bila promenjena u odgovoru na orhidektomiju (Slika 27). Apsolutan broj DN, CD4+CD8- i CD4-CD8+ JP, kao i DP TCR $\alpha\beta$ - ćelija je bio značajno ($p < 0.01$) veći u timusu orhidektomisanih, u odnosu na odgovarajuće kontrolne životinje (Slika 28).



Slika 26. Protočno citofluorimetrijska analiza distribucije osnovnih subpopulacija timocita na osnovu bojenja fluorohromima obeleženim antitelima protiv CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$.

A, B, C. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikaz **(A)** ilustruje izdvajanje ukupne populacije timocita, na osnovu veličine (FSC parametar; engl. forward light scatter) i gustine ćelija (SSC parametar; engl. side light scatter), u kojoj su **(B)**, prema intenzitetu fluorescence koju emituje PerCP kojim je obeleženo antitelo protiv TCR $\alpha\beta$, izdvojene subpopulacije timocita sa nemerljivom (TCR $\alpha\beta$ -), niskom (TCR $\alpha\beta$ +), visokom (TCR $\alpha\beta$ ++) površinskom gustinom TCR $\alpha\beta$, da bi u svakoj od njih **(C)** bila ispitana procentualna zastupljenost četiri subpopulacije ćelija (CD4-CD8-, CD4+CD8-, CD4-CD8+ i CD4+CD8+), koje su razdvajane na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani.

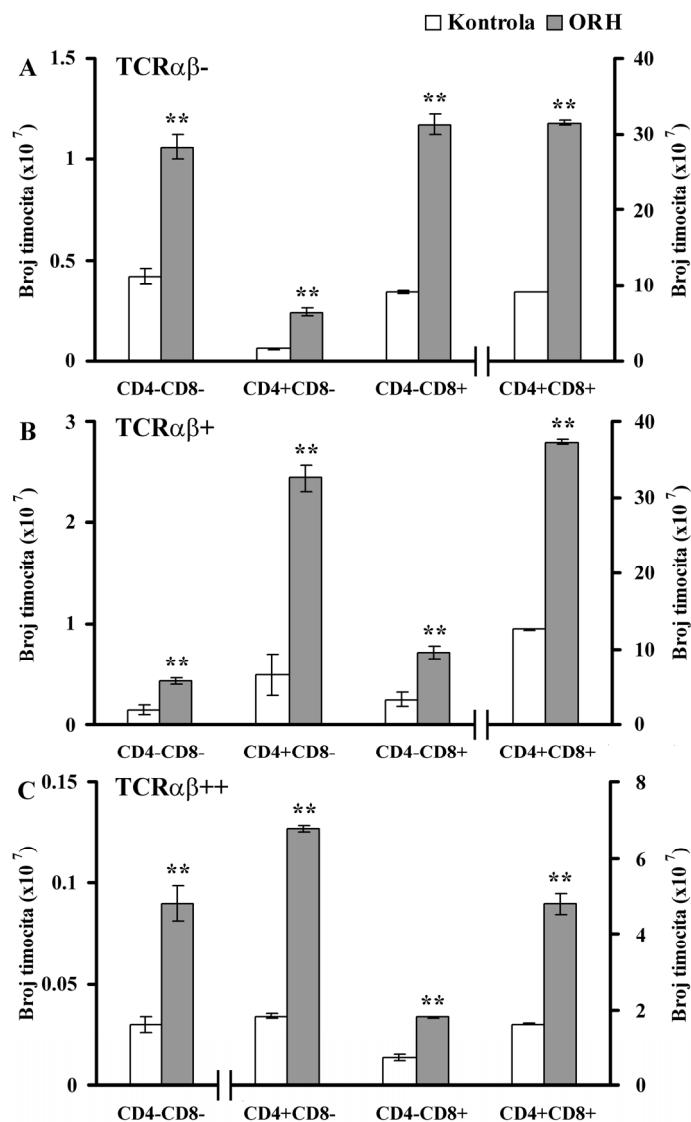


Slika 27. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na procentualnu zastupljenost timocita u okviru osnovnih subpopulacija, koje su razdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$ molekula na membrani, u timusu odraslih pacova.

A, B, C. Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost CD4-CD8-, CD4+CD8-, CD4-CD8+ i CD4+CD8+ ćelija, koje su razdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani, u okviru subpopulacija timocita sa **(A)** nemerljivom (TCR $\alpha\beta$ -), **(B)** niskom (TCR $\alpha\beta$ +) i **(C)** visokom (TCR $\alpha\beta$ ++) površinskom gustinom TCR $\alpha\beta$, u suspenzijama ćelija koje su sveže izolovane iz timusa orhidektomisanih (ORH) i lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova.

D. Histogram prikazuje odnos procentualne zastupljenosti CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ ++/CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ ++ najzrelijih jednostruko pozitivnih timocita ORH i kontrolnih pacova.

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



Slika 28. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na apsolutan broj timocita u okviru osnovnih subpopulacija, koje su razdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$ molekula na membrani, u timusu odraslih pacova.

A, B, C. Histogrami prikazuju apsolutan broj CD4-CD8-, CD4+CD8-, CD4-CD8+ i CD4+CD8+ ćelija, koje su razdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani, a koji pripadaju subpopulacijama timocita sa **(A)** nemerljivom (TCR $\alpha\beta$ -), **(B)** niskom (TCR $\alpha\beta$ +) i **(C)** visokom (TCR $\alpha\beta$ ++) površinskom gustom TCR $\alpha\beta$, u timusu orhidektomisanih (ORH) i lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova.

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

4.5.3.1.1. DN TCR $\alpha\beta$ - timociti

U sklopu subpopulacije DN timocita, kod pacova, mogu se razdvojiti ćelije na različitim stadijumima diferencijacije, a na osnovu ispoljavanja CD2 i CD45RC antigena na membrani (Law i sar., 1989). Pokazano je da orhidektomija dovodi do značajnog ($p < 0.01$) porasta procenta CD2-CD45RC⁺ i CD2+CD45RC⁺ ćelija u okviru subpopulacije DN TCR $\alpha\beta$ - timocita (Slika 29). S druge strane, u suspenziji DN TCR $\alpha\beta$ -timocita orhidektomisanih životinja, uočeno je značajno ($p < 0.01$) smanjenje procenta CD2+CD45RC⁻ ćelija (Slika 29).

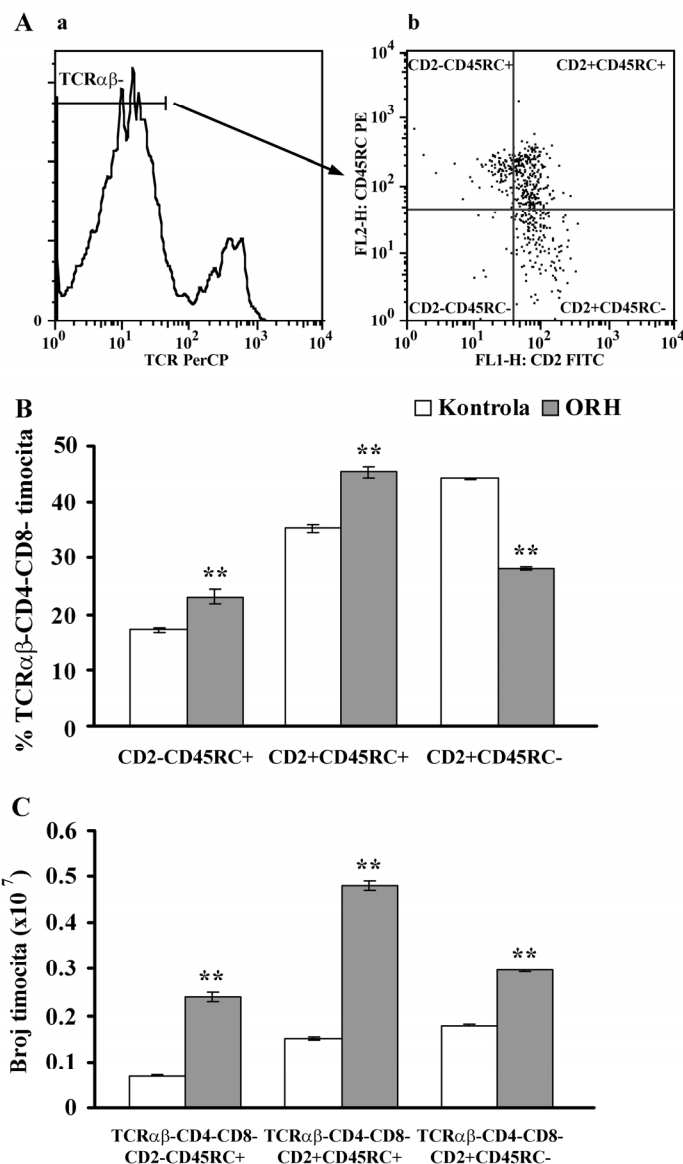
Ovi podaci ukazuju da bi smanjenje procenta DN TCR $\alpha\beta$ - timocita moglo biti posledica smanjenja relativne brojnosti CD2+CD45RC⁻ ćelija, koje svojim obimom prevazilazi povećanja relativne brojnosti ćelija CD2-CD45RC⁺ i CD2+CD45RC⁺ fenotipa.

Usled izrazitog povećanja ukupnog broja timocita, i, sledstveno, broja DN TCR $\alpha\beta$ - ćelija, i apsolutan broj ćelija pojedinih frakcija unutar subpopulacije DN TCR $\alpha\beta$ - timocita je bio statistički značajno ($p < 0.01$) povećan (Slika 29).

4.5.3.2. TCR $\alpha\beta$ + timociti

Daleko najveći deo subpopulacije TCR $\alpha\beta$ + timocita sačinjavaju ćelije DP fenotipa, koje nastaju diferencijacijom DP TCR $\alpha\beta$ - ćelija. Pokazano je da ćelije DP TCR $\alpha\beta$ + fenotipa predstavljaju ćelije koje ulaze u proces pozitivne selekcije (Miosge i Zamoyska, 2007). Orhidektomija pacova u peripubertetnom uzrastu je dovela do značajnog ($p < 0.01$) smanjenja relativne brojnosti ovih timocita (Slika 27). Pored toga, orhidektomija je dovela i do značajnog ($p < 0.01$) porasta procenta CD4+CD8⁻ JP TCR⁺ timocita, dok na relativnu brojnost CD4-CD8⁺ JP TCR⁺ i DN TCR $\alpha\beta$ + ćelija nije imala uticaja (Slika 27).

Slično kao u slučaju TCR $\alpha\beta$ - ćelija, uklanjanje muških polnih hormona je dovelo do značajnog ($p < 0.01$) povećanja apsolutne brojnosti svih subpopulacija TCR $\alpha\beta$ + timocita (Slika 28).



Slika 29. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na procentualnu zastupljenost i apsolutan broj timocita, u okviru subpopulacije CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - ćelija, koji su razdvojeni na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD2 i CD45RC molekula na membrani, u timusu odraslih pacova.

A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikaz ilustruje **(b)** površinsko ispoljavanje CD2 i CD45RC molekula u okviru **(a)** subpopulacije CD4-CD8- timocita sa nemerljivom površinskom gustinom TCR $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$ -), pri čemu su CD4-CD8- ćelije izdvojene magnetnim uklanjanjem (engl. magnetic activated cell sorting, MACS) CD4+ i CD8+ ćelija iz suspenzije ukupnih timocita.

B. Histogram prikazuje procentualnu zastupljenost CD2-CD45RC+, CD2+CD45RC+ i CD2+CD45RC- ćelija, u okviru subpopulacije CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - timocita orhidektomisanih (ORH) i lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova.

C. Histogram prikazuje apsolutan broj CD2-CD45RC+, CD2+CD45RC+ i CD2+CD45RC- timocita najnezrelijeg CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - fenotipa u timusu ORH i kontrolnih životinja.

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

4.5.3.3. TCR $\alpha\beta$ ++ timociti

Uspešnim prolaskom kroz proces pozitivne selekcije, DP TCR $\alpha\beta$ + timociti povećavaju površinsku gustinu ispoljavanja TCR $\alpha\beta$ i prelaze u DP TCR $\alpha\beta$ ++ fazu razvoja, da bi nastavile svoj razvoj ka najzrelijim CD4+CD8- ili CD4-CD8+ JP TCR++ ćelijama (Shortman i sar., 1991), koje će postati deo zrelog perifernog T-ćelijskog odeljka. Dok je procentualna zastupljenost DN, DP i CD4-CD8+ JP TCR $\alpha\beta$ ++ timocita ostala nepromenjena, relativna brojnost CD4+CD8- JP TCR $\alpha\beta$ ++ timocita je bila značajno ($p < 0.05$) povećana u odgovoru na orhidektomiju (Slika 27).

U skladu sa promenama u relativnoj zastupljenosti JP TCR $\alpha\beta$ ++ timocita kod orhidektomisanih pacova, došlo je i do značajne ($p < 0.01$) promene odnosa procentualne zastupljenosti CD4+CD8- i CD4-CD8+ JP TCR $\alpha\beta$ ++ ćelija u korist ćelija CD4+CD8- fenotipa

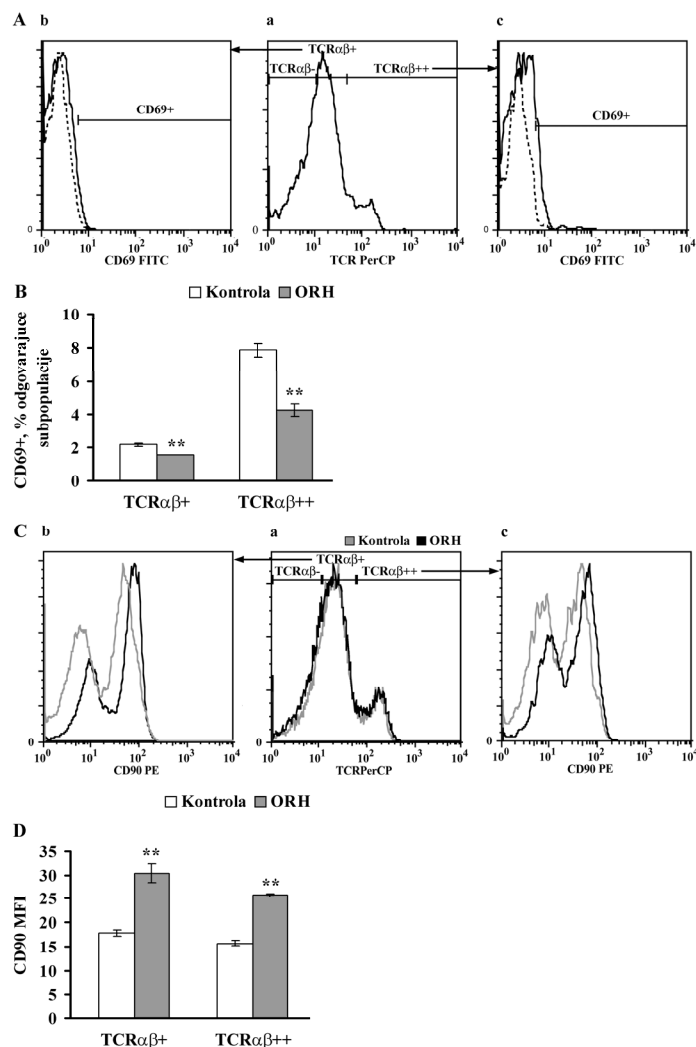
Apsolutan broj TCR++ ćelija svih fenotipova je bio značajno ($p < 0.01$) veći kod orhidektomisanih, nego kod odgovarajućih kontrolnih životinja (Slika 28).

4.5.4. Uticaj orhidektomije na selekciju timocita

Imajući u vidu da promene u relativnoj zastupljenosti subpopulacija DP ćelija najverovatnije odražavaju promene u procesima selekcije timocita, u narednom koraku ispitivana je ekspresija CD69 molekula (marker pozitivne selekcije, Yamashita i sar., 1993) i Thy-1 (CD90) molekula, od čije gustine na membrani timocita zavisi intenzitet signala koji se prenosi posredstvom TCR $\alpha\beta$ (Hueber i sar., 1997). Naime, ispitivanja kod miševa koji ne ekspimiraju gen za ovaj molekul (Thy1^{-/-} miševi), pokazala su da izostanak ispoljavanja ovog molekula smanjuje prag za negativnu selekciju i dramatično smanjuje broj timocita koji preživljavaju i sazrevaju u timusu (Hueber i sar., 1997).

4.5.4.1. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje CD69 antigena

Uklanjanje testisa dovelo je do statistički značajnog ($p < 0.01$) smanjenja procentualne zastupljenosti timocita koji na svojoj membrani ispoljavaju ovaj antigen, kako u okviru TCR $\alpha\beta$ +, tako i u okviru TCR $\alpha\beta$ ++ subpopulacije ćelija (Slika 30).



Slika 30. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na ispoljavanje CD69 i CD90 molekula na membrani sveže izolovanih timocita odraslih pacova.

A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski histogrami prikazuju ispoljavanje CD69 molekula (CD69+) u okviru subpopulacija timocita sa **(b)** niskom (TCR $\alpha\beta$ +) i **(c)** visokom (TCR $\alpha\beta$ ++) gustinom površinskog ispoljavanja TCR $\alpha\beta$ na membrani, koje su izdvajane kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskom histogramu **(a)**. Isprekidana linija predstavlja izotipsku kontrolu.

B. Histogram prikazuje procenat CD69+ ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + i TCR $\alpha\beta$ ++ subpopulacija timocita orhidektomisanih (ORH) i lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova.

C. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski histogrami prikazuju ispoljavanje CD90 molekula u okviru subpopulacija **(b)** TCR $\alpha\beta$ + i **(c)** TCR $\alpha\beta$ ++ timocita ORH (crna linija) i kontrolnih (siva linija) pacova, koje su izdvajane kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskom histogramu **(a)**.

D. Histogram prikazuje srednji intenzitet fluorescence (engl. mean fluorescence intensity, MFI) koju emituje PE vezan za antitelo protiv CD90 molekula, kojim su obeleženi timociti ORH (crna linija) i kontrolnih pacova (siva linija).

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

4.5.4.2. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje CD90 antigena

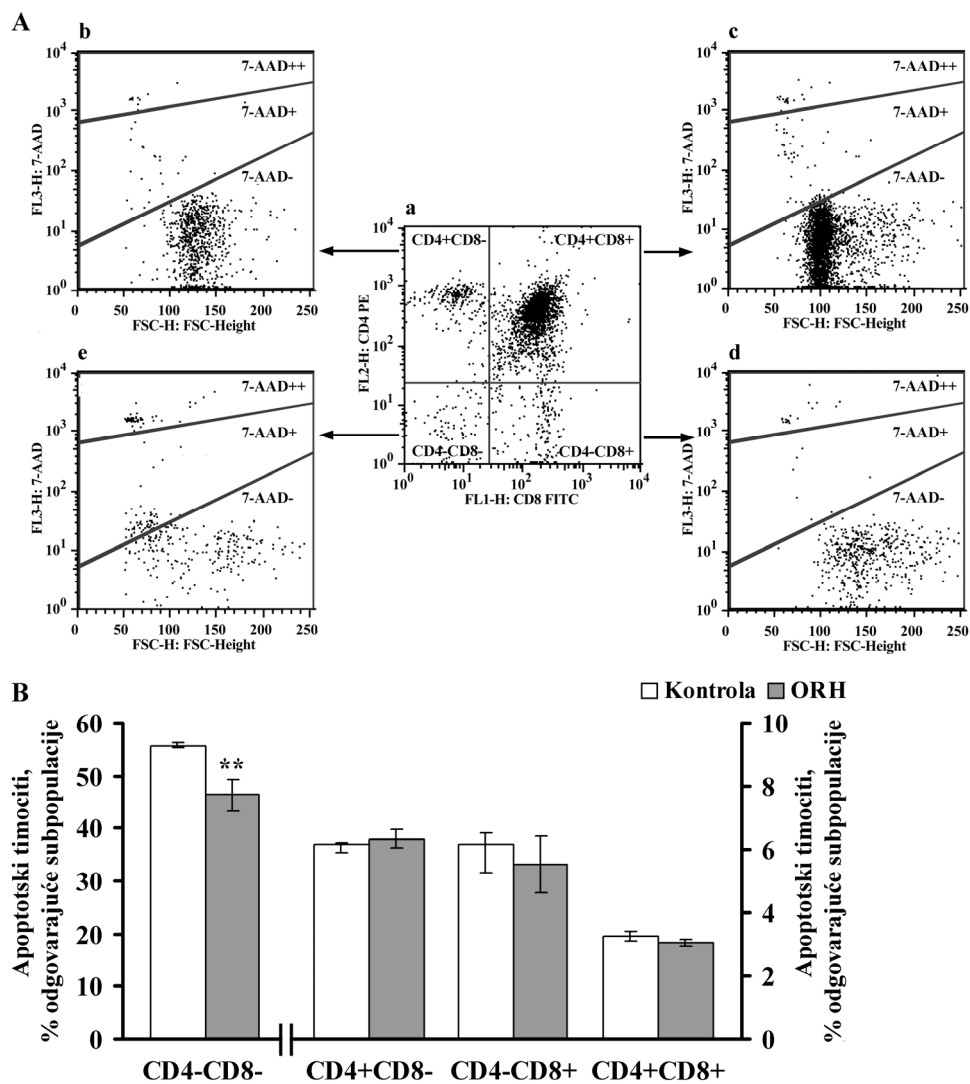
Hirurško odstranjivanje testisa dovelo je do statistički značajnog ($p < 0.01$) povećanja gustine CD90 antigena na membrani $TCR\alpha\beta+$ i $TCR\alpha\beta++$ timocita, sudeći prema srednjem intenzitetu fluorescencije koju emituje PE vezan za antitela koja specifično prepoznaju ovaj antigen (Slika 30).

4.5.5. Uticaj orhidektomije na proliferaciju i apoptozu timocita u okviru osnovnih subpopulacija ćelija, koje su razdvojene na osnovu ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora

Imajući u vidu da bi izmenjena distribucija osnovnih subpopulacija timocita mogla da odražava ne samo promene u ispoljavanju antigena diferencijacije, već i promene u apoptozu i proliferaciji u pojedinim stadijuma razvoja ovih ćelija, ispitano je da li orhidektomija 30. dana postnatalnog života utiče na procentualnu zastupljenost ćelija u apoptozu, odnosno u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa, u okviru subpopulacija sveže izolovanih timocita, razdvojenih na osnovu ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora.

4.5.5.1. Uticaj orhidektomije na apoptozu timocita u okviru osnovnih subpopulacija

Protočno citofluorimetrijska analiza sveže izolovanih timocita pokazala je da orhidektomija dovodi do značajnog ($p < 0.05$) smanjenja procenta ćelija u apoptozu u okviru DN subpopulacije timocita (Slika 31). Nasuprot tome u okviru DP, odnosno $CD4+CD8-$ i $CD4-CD8+$ JP subpopulacija timocita, orhidektomija nije dovela do značajne promene procenta timocita u apoptozu (Slika 31).



Slika 31. Protočno citofluorimetrijska analiza uticaja orhidektomije u uzrastu od 30 dana na apoptozu sveže izolovanih timocita odraslih pacova u okviru osnovnih subpopulacija.

A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi (b, c, d, e) ilustruju izdvajanje ćelija u ranim i kasnim fazama apoptoze, prema intenzitetu fluorescence koju emituje 7-AAD i veličini ćelije (FSC parametar; engl. forward light scatter), u okviru subpopulacija (b) CD4+CD8-, (c) CD4+CD8+, (d) CD4-CD8+ i (e) CD4-CD8- timocita, koje su razdvajane na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreptora na membrani, kao što je ilustrovano na protočno citofluorimetrijskom tačkastom prikazu (a). Ćelije u ranoj apoptozu se karakterišu niskim intenzitetom fluorescence koju emituje 7-AAD (7-AAD+) i većim vrednostima FSC parametra, dok se ćelije u kasnoj apoptozu karakterišu visokim intenzitetom fluorescence 7-AAD boje (7-AAD++) i smanjenjem vrednosti FSC parametra.

B. Histogram prikazuje ukupan procenat ćelija u apoptozu, u okviru subpopulacija CD4-CD8-, CD4+CD8-, CD4-CD8+ i CD4+CD8+ timocita ORH i kontrolnih pacova. Ukupan procenat ćelija u apoptozu dobijen je kao zbir procenata ćelija u ranim i kasnim fazama apoptoze.

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

4.5.5.2. Uticaj orhidektomije na proliferaciju timocita u okviru osnovnih subpopulacija

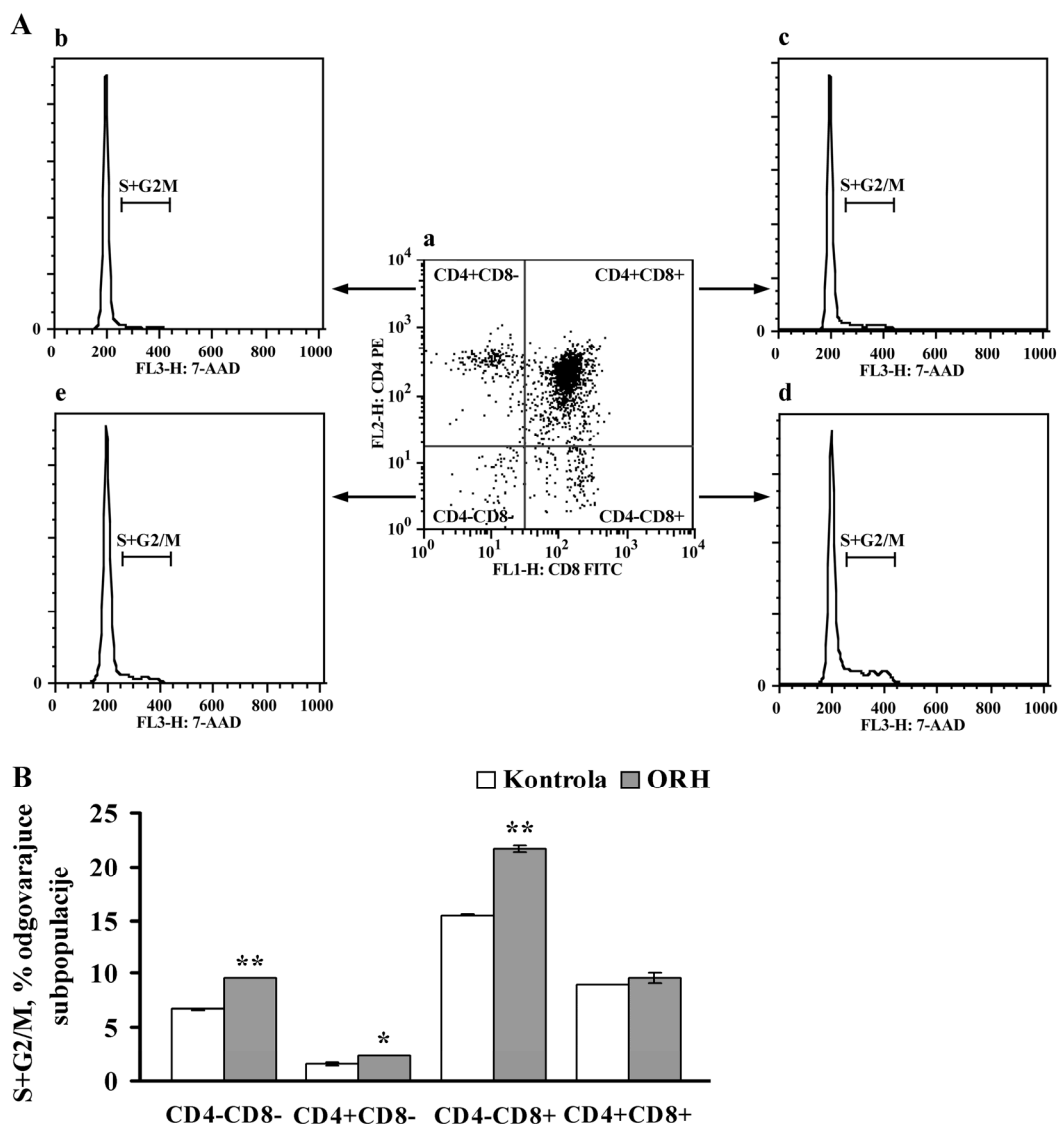
Procena relativnog broja ćelija u proliferaciji, unutar osnovnih subpopulacija sveže izolovanih timocita, pokazala je da orhidektomija utiče na proliferaciju svih osnovnih subpopulacija timocita u razvoju, izuzev ćelija DP fenotipa (Slika 32). Preciznije, orhidektomija je uzrokovala značajno ($p < 0.05$) povećanje relativnog broja timocita u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa u okviru DN, CD4+CD8- i CD4-CD8+ JP subpopulacija timocita (Slika 32).

4.5.6. Uticaj orhidektomije na zastupljenost ćelija koje ispoljavaju regulatorni fenotip u timusu

Poznato je da u timusu, osim konvencionalnih T-ćelija, nastaju i ćelije sa regulatornim fenotipom, uključene u kontrolu imunskog odgovora i sprečavanje autoimunosti (Hori i sar., 2003; Stephens i Ignatowicz, 2003; Maggi i sar., 2005). Regulatornim funkcijama se odlikuju CD4+CD25+Foxp3+ prirodne T regulatorne ćelije, kao i CD8+ ćelije koje istovremeno ispoljavaju TCR $\alpha\beta$ i CD161 receptor, poznate kao urođenoubilačke T-ćelije (Berzins i sar., 2006). Imajući ovo u vidu, ispitana je i procentualna zastupljenost ćelija koje ispoljavaju fenotip regulatornih ćelija u timusu orhidektomisanih i kontrolnih životinja.

4.5.6.1. CD4+CD25+Foxp3+ ćelije

Orhidektomija je statistički značajno ($p < 0.01$) smanjila relativan broj CD25+Foxp3+ ćelija, u okviru subpopulacije CD4+ timocita (Slika 33), i procentualnu zastupljenost CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u okviru ukupne populacije timocita (podaci nisu prikazani). Uprkos tome, s obzirom na hiperplaziju timusa kod orhidektomisanih životinja, izmeren je značajan ($p < 0.01$) porast apsolutnog broja CD4+CD25+Foxp3+ ćelija (Slika 33).

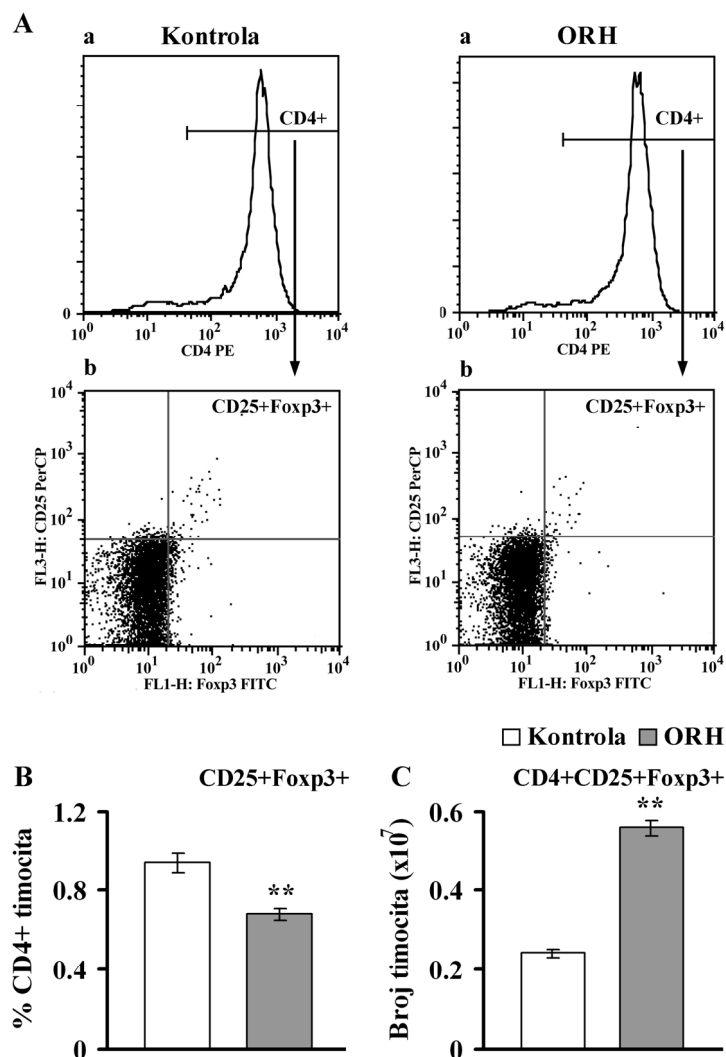


Slika 32. Protočno citofluorimetrijska analiza uticaja orhidektomije u uzrastu od 30 dana na proliferaciju sveže izolovanih timocita odraslih pacova u okviru osnovnih subpopulacija.

A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski histogrami (**b**, **c**, **d**, **e**) ilustruju izdvajanje ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (S+G2/M), prema sadržaju DNK koji je definisan stepenom vezivanja fluorescentne boje 7-AAD, u okviru subpopulacija (**b**) CD4+CD8-, (**c**) CD4+CD8+, (**d**) CD4-CD8+ i (**e**) CD4-CD8- timocita, koje su razdvajane na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani, kao što je ilustrovano na protočno citofluorimetrijskom tačkastom prikazu (**a**).

B. Histogram prikazuje procenat timocita u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa, u okviru subpopulacija CD4-CD8-, CD4+CD8-, CD4-CD8+ i CD4+CD8+ timocita ORH i kontrolnih pacova.

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



Slika 33. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na procentualnu zastupljenost i apsolutan broj CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u timusu odraslih pacova.

A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi (**b**) ilustruju ispoljavanje CD25 i Foxp3 molekula u okviru subpopulacije CD4+ timocita (levo) lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) i (desno) orhidektomisanih (ORH) pacova, koja je izdvajana kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima (**a**).

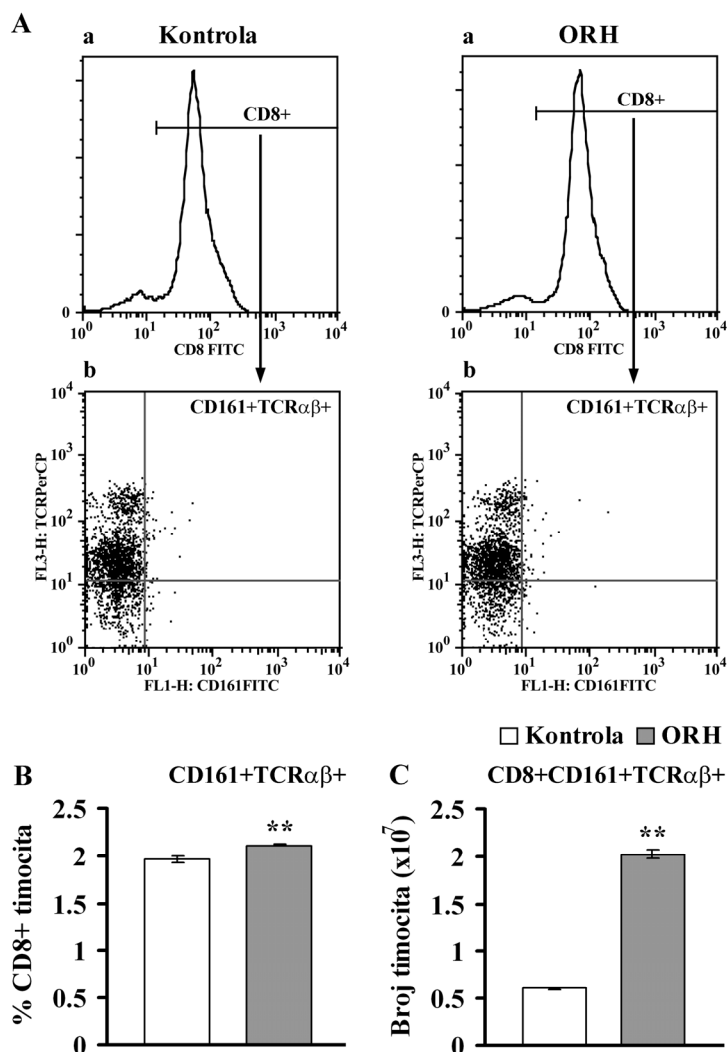
B, C. Histogrami prikazuju (**B**) procentualnu zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru subpopulacije CD4+ timocita i (**C**) apsolutan broj CD4+CD25+Foxp3+ timocita u timusu ORH i kontrolnih pacova.

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

4.5.6.2. CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelije

Relativna zastupljenost CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u okviru CD8+ subpopulacije timocita (slika 34), procenat CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u ukupnoj populaciji timocita (podaci nisu prikazani), kao i apsolutan broj CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u timusu

orhidektomisanih pacova, bili su značajno ($p < 0.01$) veći, u odnosu na kontrolne životinje (Slika 34).



Slika 34. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na procentualnu zastupljenost i apsolutan broj CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u timusu odraslih pacova.

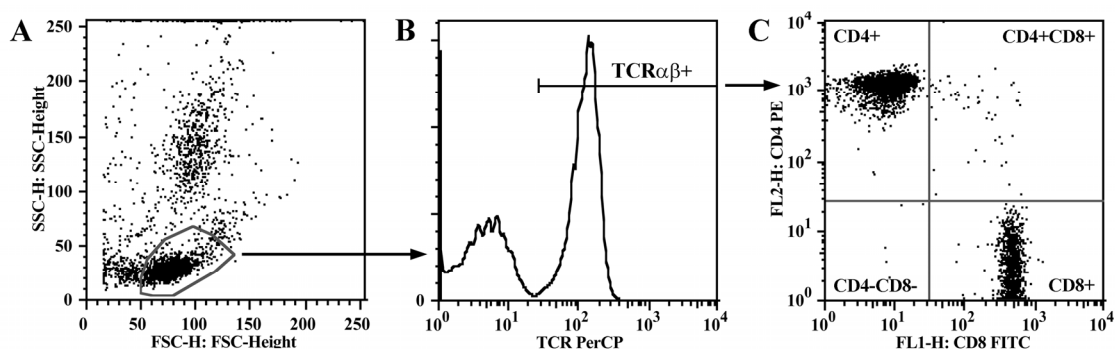
A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi (**b**) ilustruju ispoljavanje CD161 i TCR $\alpha\beta$ molekula u subpopulaciji CD8+ timocita (levo) lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) i (desno) orhidektomisanih (ORH) pacova, koja je izdvajana kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima (**a**).

B, C. Histogrami prikazuju (**B**) procentualnu zastupljenost CD161+TCR $\alpha\beta$ + timocita u okviru subpopulacije CD8+ timocita i (**C**) apsolutan broj CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + timocita u timusu ORH i kontrolnih pacova.

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

4.6. UTICAJ ORHIDEKTOMIJE NA T-ĆELIJSKI ODELJAK PERIFERNE KRVI ODRASLIH PACOVA

Široko je prihvaćeno da androgeni svoj uticaj na imunski sistem ostvaraju, prvenstveno, delujući na timus (Kovacs i Olsen, 1987). Sa druge strane, brojna istraživanja ukazuju na to da su veličina i sastav populacije perifernih T-ćelija, u značajnoj meri, kontrolisani homeostatskim mehanizmima koji su nezavisni od timusa, odnosno da doprinos novonastalih T-limfocita ovoj populaciji zavisi, u velikoj meri, i od dostupnosti T-ćelijskih „niša“ na periferiji (Hosseinzadeh i Goldschneider, 1993). Imajući ovo u vidu, da bi se procenio značaj timusnih promena kod orhidektomisanih životinja za periferiju, ispitivana je zastupljenost svežih timusnih emigranata, glavnih subpopulacija T-ćelija (Slika 35) i regulatornih T-ćelija u perifernoj krvi.

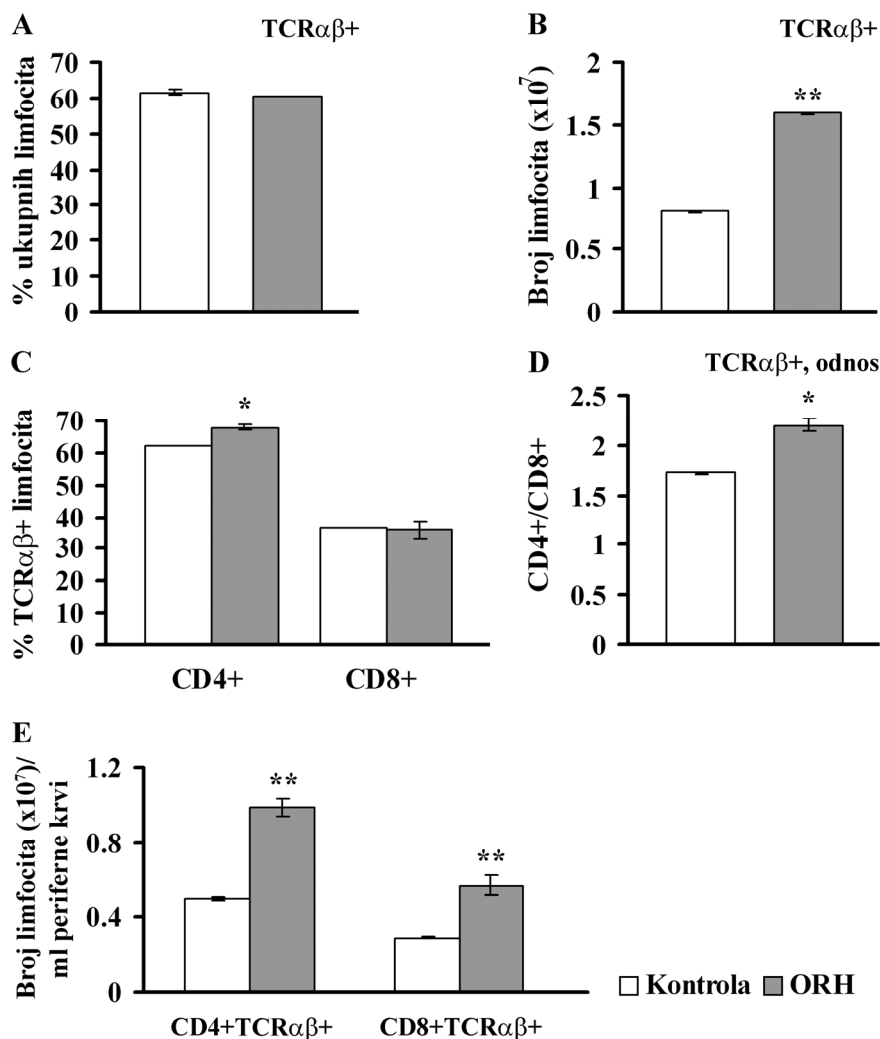


Slika 35. Protočno citofluorimetrijska analiza distribucije osnovnih subpopulacija T-limfocita u perifernoj krvi.

A, B, C. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikaz (**C**) ilustruje ispoljavanje CD4 i CD8 koreceptora u subpopulaciji T-limfocita perifernoj krvi ($TCR\alpha\beta+$), koji su izdavažani kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskom histogramu (**B**), iz ukupne populacije limfocita, koja je definisana na osnovu veličine (FSC parametar; engl. forward light scatter) i gustine ćelija (SSC parametar; engl. side light scatter), što je ilustrovano na protočno citofluorimetrijskom tačkastom prikazu (**A**).

4.6.1. Populacija T-ćelija

Hirurško uklanjanje testisa nije dovelo do promene procentualne zastupljenosti T-limfocita ($TCR\alpha\beta+$ ćelija) u perifernoj krvi (Slika 36), dok je apsolutan broj T-ćelija perifernoj krvi orhidektomisanih pacova bio značajno ($p < 0.01$) povećan (Slika 36).



Slika 36. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na zastupljenost CD4+ i CD8+ T-ćelija u perifernoj krvi odraslih pacova.

A, B. Histogrami prikazuju (A) procentualnu zastupljenost i (B) broj T-limfocita (TCR $\alpha\beta$ + ćelija) u perifernoj krvi orhidektomisanih (ORH) i lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) pacova.

C, D. Histogrami prikazuju (C) procentualnu zastupljenost CD4+ i CD8+ ćelija, koje su razdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani, u okviru populacije T-limfocita, kao i (D) odnos procentualne zastupljenosti CD4+/CD8+ limfocita u okviru populacije T-ćelija u perifernoj krvi ORH i kontrolnih pacova.

F. Histogram prikazuje ukupan broj CD4+ i CD8+ T-limfocita periferne krvi ORH i kontrolnih pacova.

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

4.6.2. CD4+ i CD8+ subpopulacije T-limfocita

Orhidektomija je uzrokovala značajno (p<0.05) povećanje procentualne zastupljenosti CD4+ limfocita u okviru populacije TCR $\alpha\beta$ + ćelija periferne krvi, u

odnosu na kontrolne životinje (Slika 36). Kako, istovremeno, nije došlo do promene u relativnoj brojnosti CD8⁺ limfocita, u okviru T-ćelijskog odeljka periferne krvi, odnos procentualne zastupljenosti CD4⁺ i CD8⁺ T-ćelija periferne krvi bio je značajno ($p < 0.05$) povećan (Slika 36).

Apsolutan broj i CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ i CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-ćelija u perifernoj krvi bio je značajno ($p < 0.01$) povećan kod orhidektomisanih pacova, u odnosu na odgovarajuće kontrolne životinje (Slika 36).

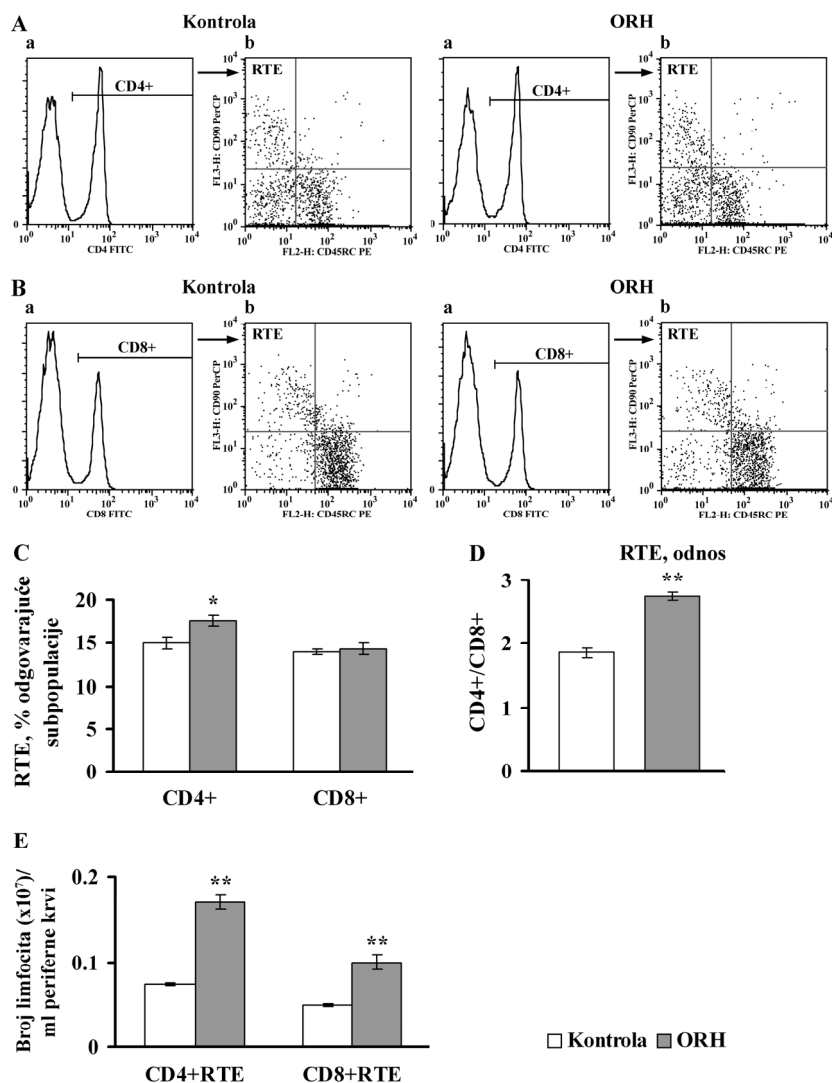
4.6.3. CD4⁺ i CD8⁺ sveži timusni emigranti

Prisustvo T-ćelija koje su nedavno potekle iz timusa, odnosno svežih timusnih emigranata u perifernoj krvi se smatra merilom efikasnosti timopoeze (Okamoto i sar., 2002). Sveži timusni emigranti kod pacova su okarakterisani kao CD4⁺ ili CD8⁺ T-ćelije koje na svojoj površini još uvek ispoljavaju CD90 antigen, ali ne i CD45RC molekul, koji je karakterističan za zrele naivne T-limfocite (Hosseinzadeh i Goldschneider, 1993). Orhidektomija je dovela do značajnog ($p < 0.05$) povećanja relativne zastupljenosti svežih timusnih emigranata u okviru subpopulacije CD4⁺ T-ćelija, ne utičući na procenat svežih timusnih emigranata u subpopulaciji CD8⁺ T-ćelija, pa, sledstveno, i do značajnog ($p < 0.01$) pomeranja odnosa procentualne zastupljenosti CD4⁺ i CD8⁺ svežih timusnih emigranata u okviru populacije T-ćelija prema CD4⁺ fenotipu (Slika 37).

Apsolutan broj svežih timusnih emigranata oba fenotipa je bio značajno ($p < 0.01$) povećan u perifernoj krvi orhidektomisanih pacova (Slika 37).

4.6.4. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelije

Promena procentualne zastupljenosti CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija u subpopulaciji CD4⁺ limfocita periferne krvi orhidektomisanih pacova nije pratila odgovarajuću promenu uočenu u timusu. Naime, u odnosu na odgovarajuće kontrolne životinje, orhidektomija je dovela do značajnog ($p < 0.05$) povećanja procentualne zastupljenosti CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija među CD4⁺ limfocitima periferne krvi, uz značajan ($p < 0.01$) porast njihove apsolutne brojnosti (Slika 38).



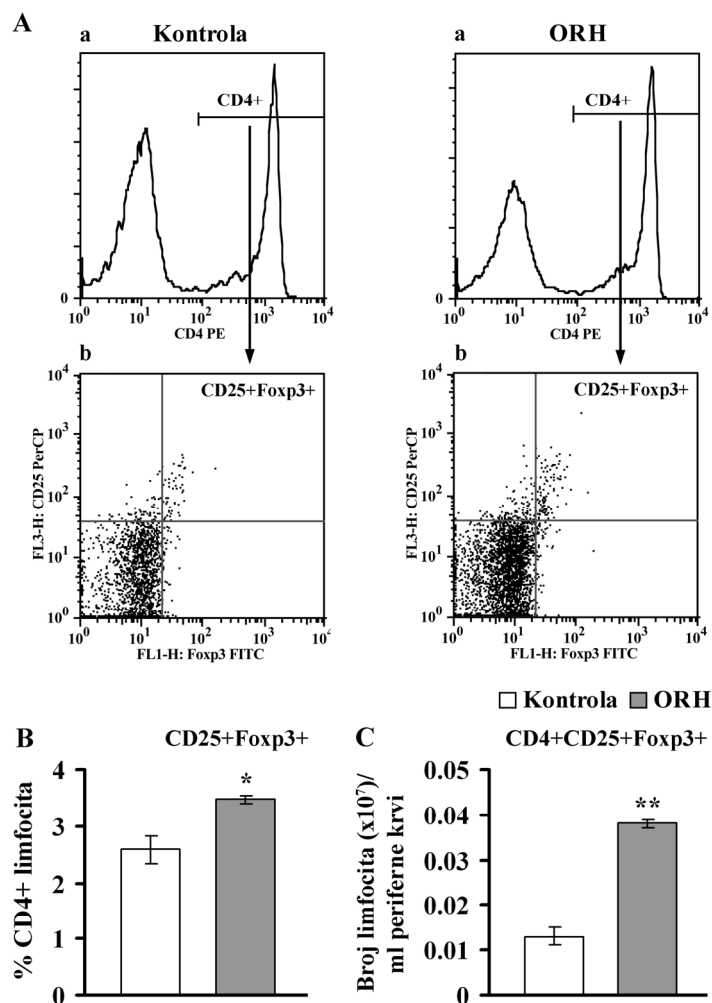
Slika 37. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na zastupljenost CD4+ i CD8+ svežih timusnih emigranata u perifernoj krvi odraslih pacova.

A, B. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi (**b**) ilustruju izdvajanje CD90+CD45RC- svežih timusnih emigranata (engl. recent thymic emigrants, RTE) u okviru subpopulacija (**A**) CD4+ i (**B**) CD8+ T-limfocita ($\text{TCR}\alpha\beta^+$ ćelije) perifernoj krvi (levo) lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) i (desno) orhidektomisanih (ORH) pacova, koje su izdvajane kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima (**a**). T-limfociti su dobijeni magnetnim izdvajanjem (engl. magnetic activated cell sorting, MACS) $\text{TCR}\alpha\beta^+$ ćelija iz suspenzija ukupnih limfocita perifernoj krvi.

C, D. Histogrami prikazuju (**C**) procentualnu zastupljenost svežih timusnih emigranata u okviru CD4+ i CD8+ subpopulacija T-ćelija i (**D**) odnos procentualne zastupljenosti CD4+/CD8+ svežih timusnih emigranata u okviru populacije T-ćelija u perifernoj krvi ORH i kontrolnih pacova.

E. Histogram prikazuje ukupan broj CD4+ i CD8+ svežih timusnih emigranata u perifernoj krvi ORH i kontrolnih pacova.

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



Slika 38. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na procentualnu zastupljenost i apsolutan broj CD4+CD25+Foxp3+ prirodnih regulatornih ćelija u perifernoj krvi odraslih pacova.

A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi (**b**) ilustruju ispoljavanje CD25 i Foxp3 molekula u subpopulaciji CD4+ limfocita perifernje krvi (levo) lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) i (desno) orhidektomisanih (ORH) pacova, koja je izdvajana kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima (**a**).

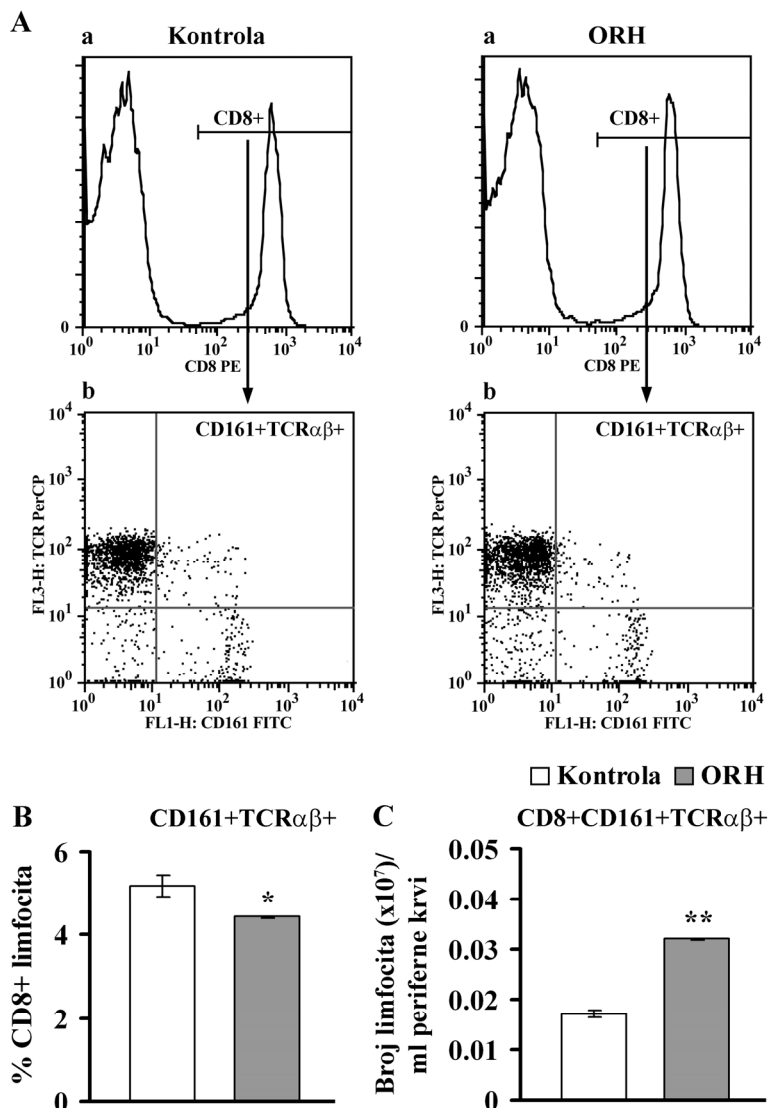
B, C. Histogrami prikazuju (**B**) procentualnu zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ subpopulacije limfocita i (**C**) apsolutan broj CD4+CD25+Foxp3+ limfocita u perifernoj krvi ORH i kontrolnih pacova.

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

4.6.5. CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + NKT ćelije

Obrazac promena zastupljenosti NKT ćelija uočen u perifernoj krvi orhidektomisanih pacova nije u potpunosti odgovarao onom uočenom u timusu istih životinja. Naime, značajno (p<0.05) smanjenje relativnog učešća CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija uočen u timusu orhidektomisanih pacova nije u potpunosti odgovarao onom uočenom u timusu istih životinja.

ćelija u okviru subpopulacije CD8⁺ ćelija, bilo je spregnuto sa značajnim ($p < 0.01$) povećanjem ukupnog broja CD8⁺CD161⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ limfocita, u perifernoj krvi orhidektomisanih pacova (Slika 39).



Slika 39. Uticaj orhidektomije u uzrastu od 30 dana na procentualnu zastupljenost i apsolutan broj CD8⁺CD161⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ urodenoubilačkih T regulatornih ćelija u perifernoj krvi odraslih pacova.

A. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi (**b**) ilustruju ispoljavanje CD161 i TCR $\alpha\beta$ molekula u subpopulaciji CD8⁺ limfocita periferne krvi (levo) lažno orhidektomisanih kontrolnih (Kontrola) i (desno) orhidektomisanih (ORH) pacova, koja je izdvajana kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima (**a**).

B, C. Histogrami prikazuju (**B**) procentualnu zastupljenost CD161+TCR $\alpha\beta$ ⁺ ćelija u okviru CD8⁺ subpopulacije limfocita i (**C**) apsolutan broj CD8⁺CD161+TCR $\alpha\beta$ ⁺ limfocita u perifernoj krvi ORH i kontrolnih pacova.

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

4.7. UTICAJ DUGOTRAJNOG TRETMANA PROPRANOLOLOM NA DIFERENCIJACIJU/SAZREVANJE TIMOCITA U PRISUSTVU I ODSUSTVU HORMONA TESTISA

S obzirom na to da je pokazano da uklanjanje izvora muških polnih hormona u uzrastu od 30 dana utiče na proces timopoeze odraslih pacova, postavilo se pitanje da li su uočene promene, bar jednim delom, posledica smanjenja koncentracije noradrenalina, odnosno ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora u timusu. U cilju dobijanja odgovora na ovo pitanje, ispitivan je uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na timopoezu u prisustvu i odsustvu hormona testisa.

4.7.1. Uticaj tretmana propranololom na ukupan broj timocita i masu timusa

Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da propranolol nije uticao ni na apsolutnu ni na relativnu (izraženu u odnosu na 100 g telesne mase) masu timusa i da taj efekat nije zavisio od prisustva hormona testisa (Tabela 2). Takođe, nezavisno od prisustva hormona testisa, nakon tretmana propranololom nije došlo do značajne promene ni u apsolutnom ni u relativnom (izraženom u odnosu na 100 g telesne mase) broju timocita (Tabela 2).

Tabela 2. Vrednosti apsolutne i relativne mase timusa i apsolutnog i relativnog broja timocita kod odraslih pacova neorhidektomisanih (NEORH) i orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR).

	Masa timusa [g]	Relativna masa timusa [g/100 g telesne mase]	Broj timocita [x 10 ⁷]	Relativan broj timocita [x 10 ⁷ /100 g telesne mase]
NEORH+FR	0.397±0.03	0.17±0.01	48.7±3.26	20.44±1.00
NEORH+PR	0.38±0.02	0.19±0.01	42.87±1.84	20.88±1.51
ORH+FR	0.78±0.05	0.33±0.01	90.58±6.305	39.07±1.00
ORH+PR	0.71±0.01	0.31±0.01	87.385±1.385	37.58±0.65

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. (n=6).

4.7.2. Uticaj tretmana propranololom na apoptozu i proliferaciju timocita

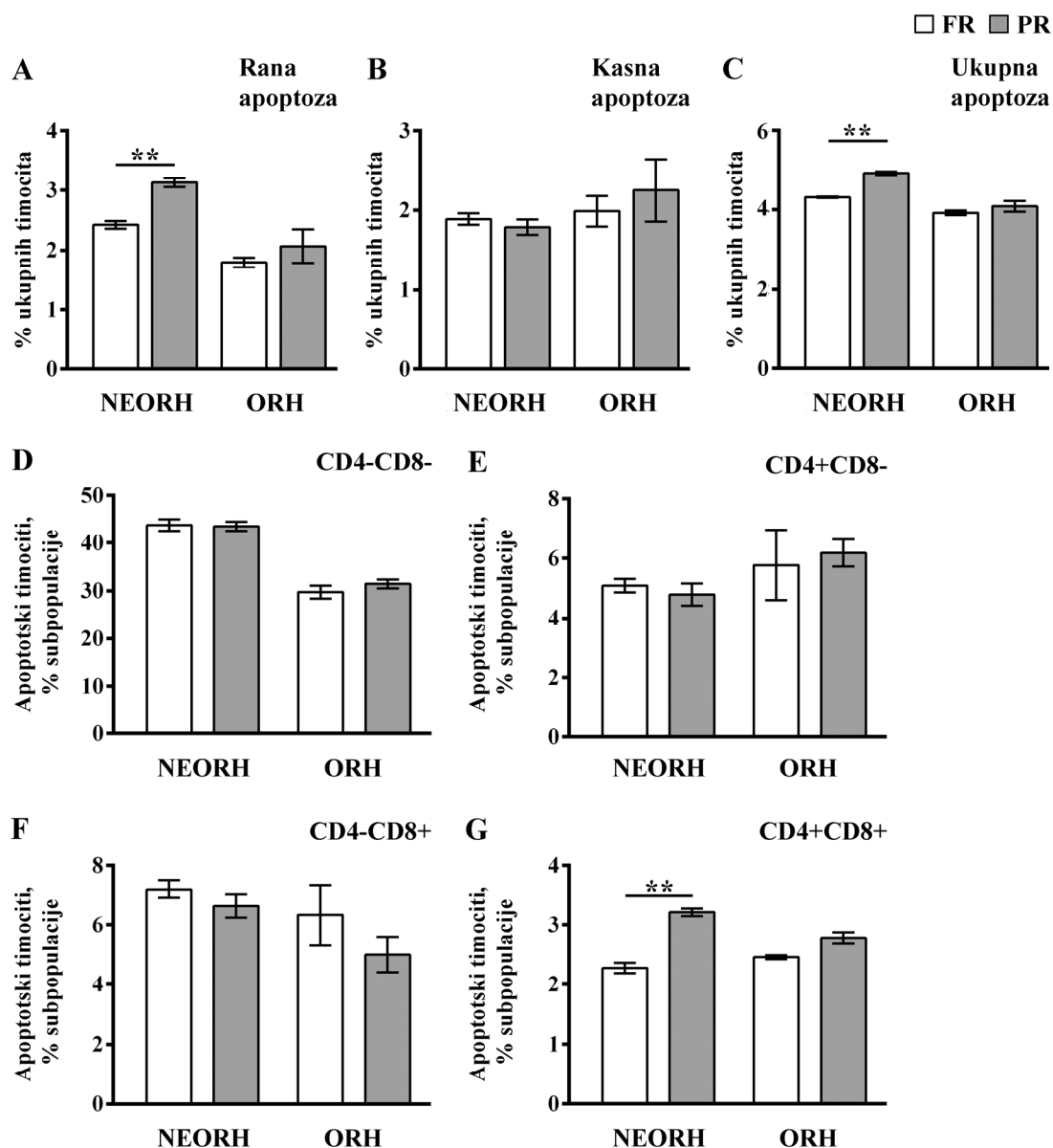
Imajući u vidu da hemijska simpatektomija, *in situ* u timusu, povećava procenat timocita koji umiru apoptozom, kao i procenat timocita koji proliferišu (Al-Shawaf i sar., 1991), ispitano je da li dugotrajan tretman propranololom utiče na pomenute homeostatske procese.

4.7.2.1. Uticaj tretmana propranololom na apoptozu timocita

Kao što je bilo i očekivano (Al-Shawaf i sar., 1991), u suspenzijama sveže izolovanih timocita iz timusa neorhidektomisanih životinja tretiranih propranololom, procenat ćelija u apoptozi bio je statistički značajno ($p < 0.01$) veći nego u suspenzijama timocita koji su izolovani iz timusa kontrolnih životinja, kojima je ubrizgavan fiziološki rastvor (Slika 40). Ovaj efekat propranolola odražavao je značajno ($p < 0.01$) povećanje procenta timocita u ranim fazama apoptoze, dok je procenat ćelija u kasnim fazama apoptoze bio isti u suspenzijama timocita izolovanih iz timusa propranololom tretiranih pacova i životinja kojima je ubrizgavan fiziološki rastvor (Slika 40).

Sa druge strane, nije bilo značajne razlike u procentu apoptotskih ćelija između suspenzija timocita sveže izolovanih iz orhidektomisanih životinja tretiranih propranololom i suspenzija timocita sveže izolovanih iz orhidektomisanih životinja kojima je davan fiziološki rastvor (Slika 40).

Dakle, propranolol je samo u prisustvu hormona testisa značajno uticao na apoptozu timocita [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=10.56$, $p=0.0054$] i to povećavajući procenat ćelija u ranim fazama apoptoze [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=4.02$, $p=0.049$].



Slika 40. Uticaj četrnaestodnevno tretmana propranololom na apoptozu sveže izolovanih timocita neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A, B, C. Histogrami prikazuju procenat timocita u **(A)** ranim i **(B)** kasnim fazama apoptoze, kao i **(C)** ukupan procenat timocita u apoptozu u suspenzijama ćelija koje su sveže izolovane iz timusa odraslih mužjaka pacova neorhidektomisanih (NEORH) i orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR). Ukupan procenat ćelija u apoptotozi dobijen je kao zbir procenata ćelija u ranim i kasnim fazama apoptoze.

D, E, F, G. Histogrami prikazuju ukupan procenat timocita u apoptozu, u okviru osnovnih subpopulacija **(D)** CD4-CD8-, **(E)** CD4+CD8-, **(F)** CD4-CD8+ i **(G)** CD4+CD8+ ćelija, koje su izdvajane na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani, u suspenzijama timocita NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

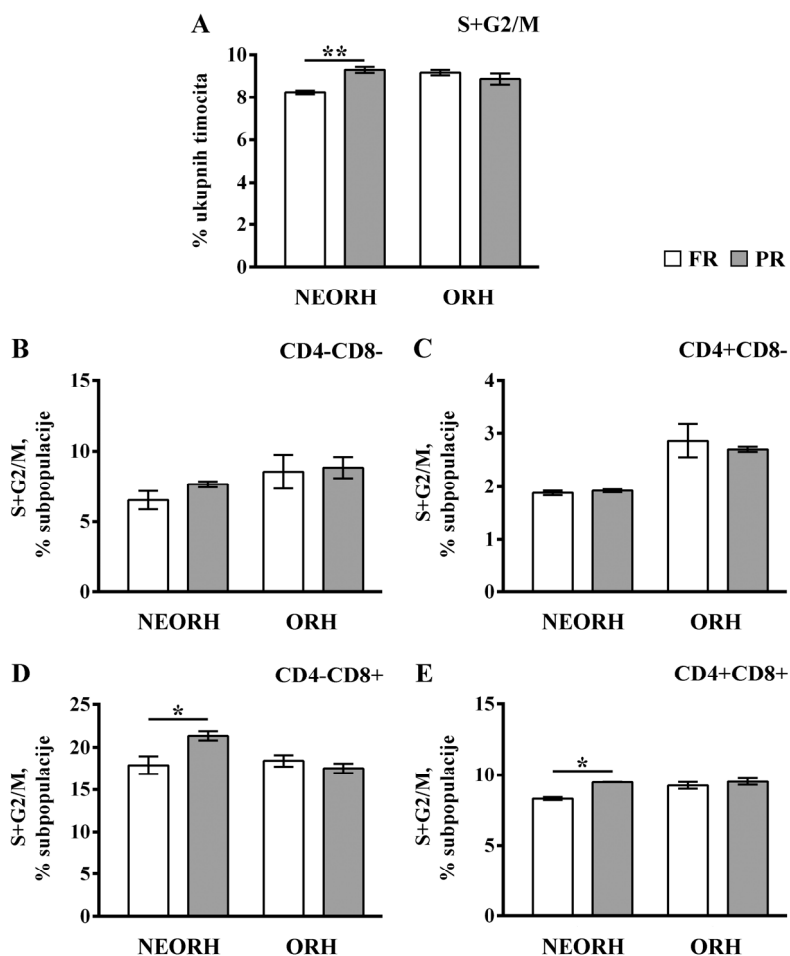
Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. (n=6). ** p<0.01.

4.7.2.2. Uticaj tretmana propranololom na proliferaciju timocita

Shodno citiranim podacima (Al-Shawaf i sar., 1991), davanje propranolola neorhidektomisanim životinjama dovelo je do značajnog ($p < 0.01$) povećanja procentualne zastupljenosti ćelija u proliferaciji u suspenzijama sveže izolovanih timocita (Slika 41).

Procenat ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa bio je nepromenjen u suspenzijama timocita izolovanih iz orhidektomisanih životinja kojima je davan propranolol, u odnosu na suspenzije timocita orhidektomisanih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor (Slika 41).

Dakle, propranolol je na proliferaciju timocita značajno uticao samo kod neorhidektomisanih životinja [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=16.79$, $p=0.0006$].



Slika 41. Uticaj četrnaestodnevno tretmana propranololom na proliferaciju sveže izolovanih timocita neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A. Histogram prikazuje procenat timocita u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (S+G2/M) u suspenzijama ćelija koje su sveže izolovane iz timusa odraslih mužjaka pacova neorhidektomisanih (NEORH) i orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR).

B, C, D, E. Histogrami prikazuju procenat timocita u S+G2/M fazama ćelijskog ciklusa, u okviru osnovnih subpopulacija (**B**) CD4-CD8-, (**C**) CD4+CD8-, (**D**) CD4-CD8+ i (**E**) CD4+CD8+ ćelija, koje su izdvajane na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani, u suspenzijama timocita NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

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

4.7.3. Uticaj tretmana propranololom na ispoljavanje antigena diferencijacije na membrani timocita

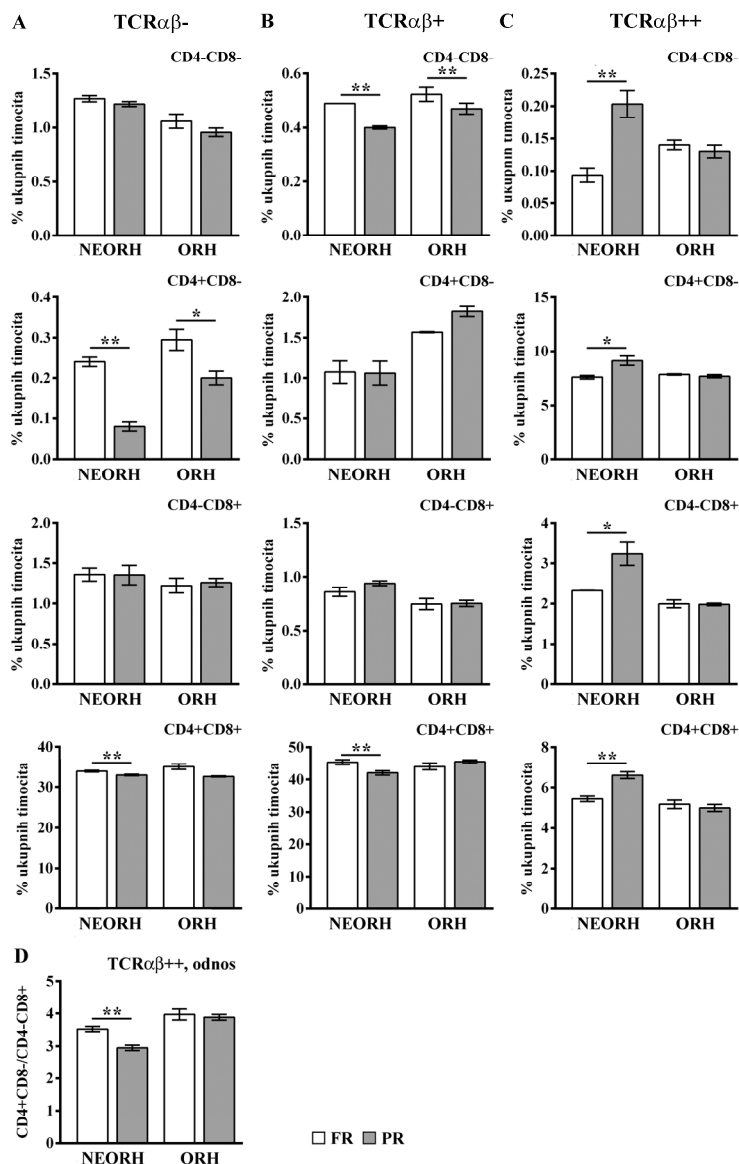
4.7.3.1 TCR $\alpha\beta$ - timociti

Subpopulacije najnezrelijih timocita su pokazale različit odgovor na delovanje propranolola kod nekastriranih životinja. Propranolol nije statistički značajno uticao na procentat najnezrelijih DN TCR $\alpha\beta$ - timocita, kao ni na relativnu zastupljenost male subpopulacije CD4-CD8+ TCR $\alpha\beta$ - JP ćelija (Slika 42). Nasuprot tome, kod neorhidektomisanih pacova kojima je davan propranolol, procenat CD4+CD8- JP TCR $\alpha\beta$ - i DP TCR $\alpha\beta$ - timocita bio je značajno ($p < 0.01$) manji nego kod odgovarajućih kontrolnih životinja kojima je davan fiziološki rastvor (Slika 42).

Budući da četrnaestodnevno ubrizgavanje propranolola neorhidektomisanim životinjama nije dovelo do promene ukupnog broja timocita, promene u apsolutnom broju pojedinih subpopulacija TCR $\alpha\beta$ - timocita su odgovarale promenama u njihovoj procentualnoj zastupljenosti. Naime, dok je ukupan broj DN TCR $\alpha\beta$ - i CD4-CD8+ TCR $\alpha\beta$ - JP timocita ostao nepromenjen, apsolutna veličina CD4+CD8- JP TCR $\alpha\beta$ - i DP TCR $\alpha\beta$ - subpopulacija je bila značajno ($p < 0.01$) smanjena (Slika 43).

U odsustvu hormona testisa, efekat propranolola na procentualnu zastupljenost DP TCR $\alpha\beta$ - timocita je bio jače izražen nego u njihovom prisustvu [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=6.14$, $p=0.0248$]. Efekat tretmana propranololom na ostale subpopulacije TCR $\alpha\beta$ - timocita orhidektomisanih pacova nije se značajno razlikovao u odnosu na neorhidektomisane životinje (Slika 42).

Uklanjanje testisa u uzrastu od 30 dana nije uzrokovalo značajne promene u delovanju propranolola na apsolutan broj timocita u okviru nijedne od subpopulacija TCR $\alpha\beta$ - ćelija (Slika 43).

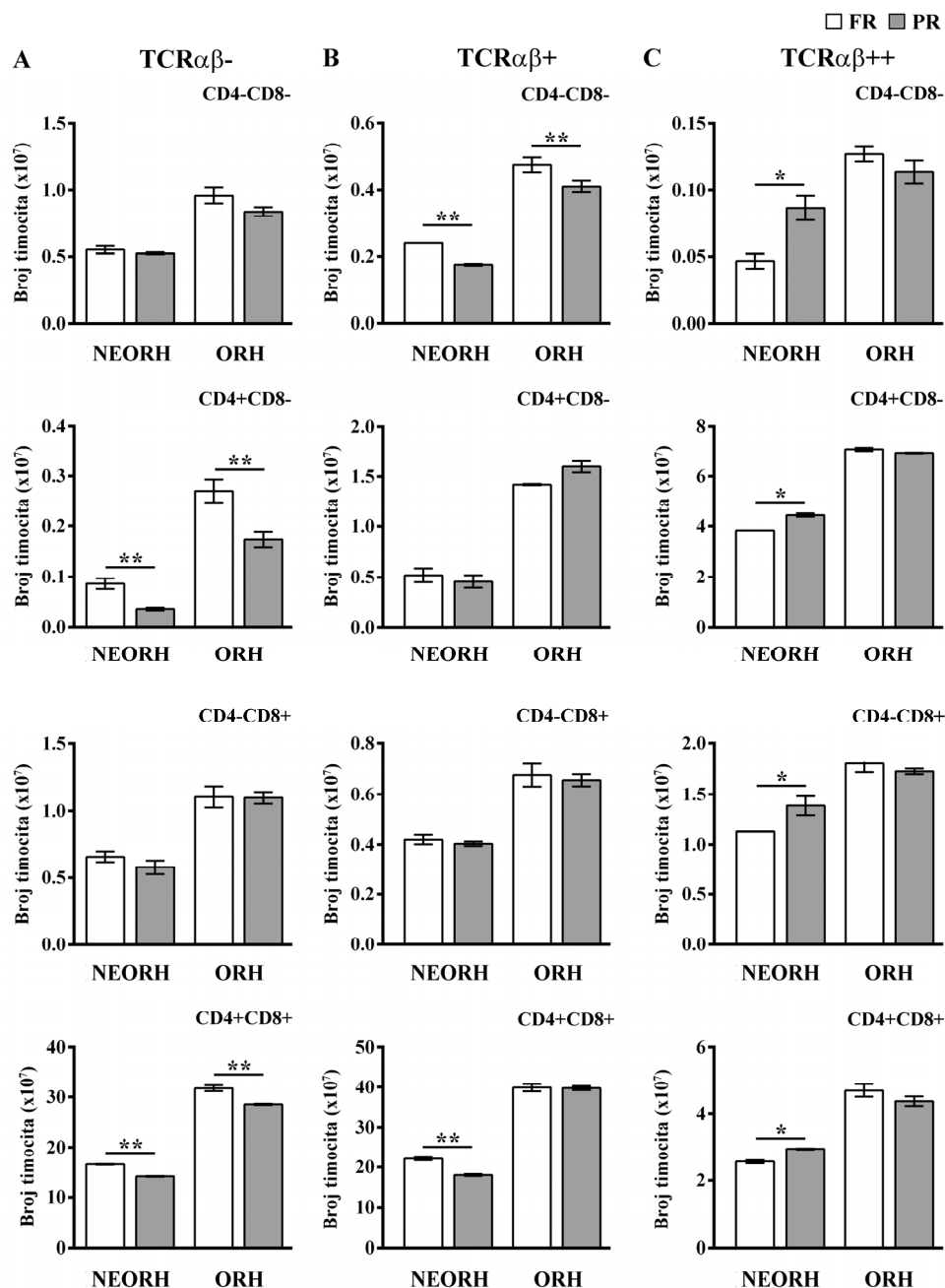


Slika 42. Uticaj četrnaestodnevog tretmana propranololom na procentualnu zastupljenost timocita u okviru osnovnih subpopulacija, koje su razdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$ molekula na membrani, u timusu neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A, B, C. Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost CD4-CD8-, CD4+CD8-, CD4-CD8+ i CD4+CD8+ ćelija, koje su razdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani, u okviru subpopulacija timocita sa **(A)** nemerljivom (TCR $\alpha\beta$ -), **(B)** niskom (TCR $\alpha\beta$ +) i **(C)** visokom (TCR $\alpha\beta$ ++) površinskom gustinom TCR $\alpha\beta$, u suspenzijama ćelija koje su sveže izolovane iz timusa odraslih mužjaka pacova, neorhidektomisanih (NEORH) i orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR).

D. Histogram prikazuje odnos procentualne zastupljenosti CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ ++/CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ ++ najzrelijih jednostruko pozitivnih timocita NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

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



Slika 43. Uticaj četrnaestodnevno tretmana propranololom na apsolutan broj timocita u okviru osnovnih subpopulacija, koje su razdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4, CD8 i TCR $\alpha\beta$ molekula na membrani, u timusu neorhizektomisanih i orhizektomisanih pacova.

A, B, C. Histogrami prikazuju apsolutan broj CD4-CD8-, CD4+CD8-, CD4-CD8+ i CD4+CD8+ ćelija, koje su razdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani, a koji pripadaju subpopulacijama timocita sa (A) nemerljivom (TCR $\alpha\beta^-$), (B) niskom (TCR $\alpha\beta^+$) i (C) visokom (TCR $\alpha\beta^{++}$) površinskom gustinom TCR $\alpha\beta$, u timusu odraslih mužjaka pacova neorhizektomisanih (NEORH) i orhizektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR).

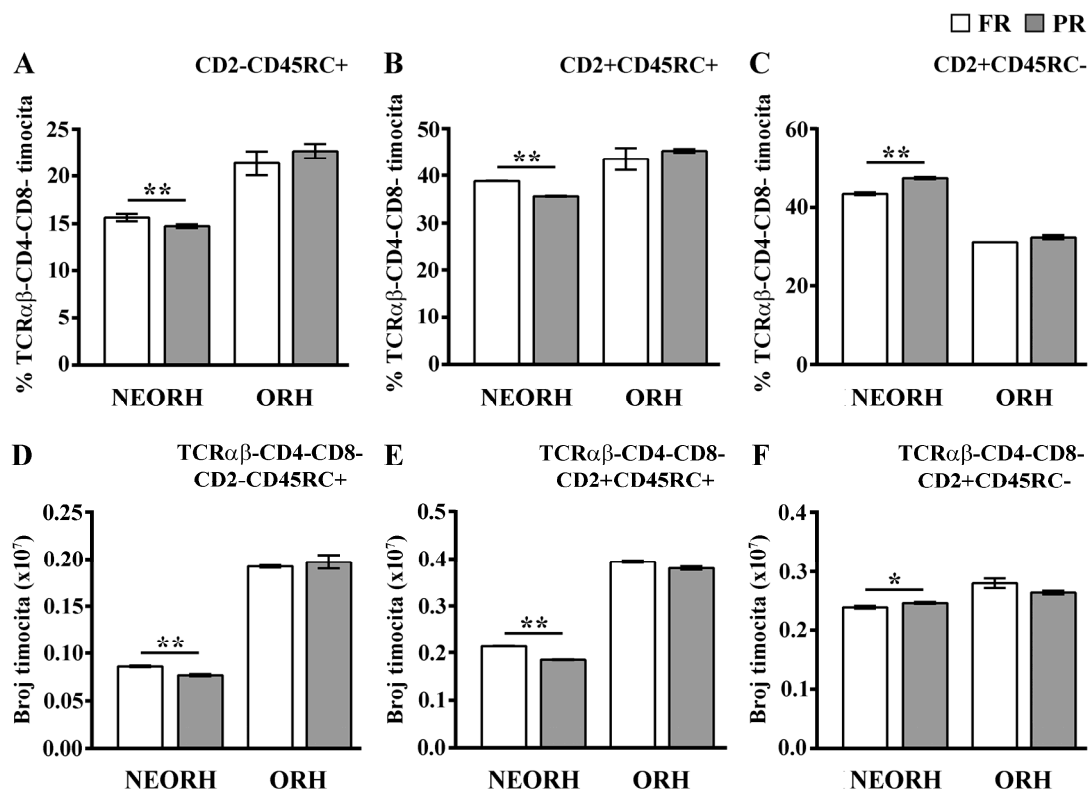
Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. (n=6). * p<0.05; ** p<0.01.

4.7.3.1.1 DN TCR $\alpha\beta$ - timociti

Analiza fenotipskih karakteristika DN TCR $\alpha\beta$ - timocita je pokazala da, kod neorhidektomisanih životinja koje su primale propranolol, dolazi do statistički značajnog ($p < 0.01$) smanjenja procentualne zastupljenosti obe subpopulacije DN TCR $\alpha\beta$ - ćelija sa regenerativnim kapacitetom, tj. CD2-CD45RC+ i CD2+CD45RC+ timocita (Law i sar., 1989), uz značajno ($p < 0.01$) povećanje procentualne zastupljenosti CD2+CD45RC- ćelija (Slika 44). Ovakve promene odnosa pojedinih frakcija DN TCR $\alpha\beta$ - timocita nisu uočene kod orhidektomisanih životinja, tako da je dvofaktorska analiza varijanse pokazala značajne orhidektomija x propranolol interakcije [CD2-CD45RC+, $F(1,20)=5.18$, $p=0.034$; CD2+CD45RC+, $F(1,20)=23.29$, $p=0.0001$; CD2+CD45RC-, $F(1,20)=7.2$, $p=0.0157$] (Slika 44).

Kako ukupan broj DN TCR $\alpha\beta$ - ćelija u timusu neorhidektomisanih životinja tretiranih propranololom nije bio promenjen, promene apsolutne brojnosti pojedinih frakcija ove subpopulacije timocita su odgovarale promenama u njihovoj procentualnoj zastupljenosti. Naime, pod uticajem tretmana došlo je do značajnog ($p < 0.01$) smanjenja ukupnog broja CD2-CD45RC+ i CD2+CD45RC+ ćelija, dok je broj CD2+CD45RC- timocita DN TCR $\alpha\beta$ - fenotipa bio značajno ($p < 0.05$) povećan (Slika 44).

Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da je, u odsustvu hormona testisa, uticaj tretmana propranololom na apsolutan broj pojedinih frakcija DN TCR $\alpha\beta$ - timocita bio potpuno uklonjen [CD2-CD45RC+ DN TCR $\alpha\beta$ -, $F(1,20)=4.8$, $p=0.0446$; CD2+CD45RC+ DN TCR $\alpha\beta$ -, $F(1,20)=9.87$, $p < 0.006$; CD2+CD45RC-, $F(1,20)=4.6$, $p=0.0467$] (Slika 44).



Slika 44. Uticaj četrnaestodnevno tretmana propranololom na procentualnu zastupljenost i apsolutan broj timocita u okviru subpopulacije CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - ćelija, koji su razdvojeni na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD2 i CD45RC molekula na membrani, u timusu neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A, B, C. Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost (A) CD2-CD45RC+, (B) CD2+CD45RC+ i (C) CD2+CD45RC- timocita, koji su razdvojeni na osnovu nivoa površinskog ispoljavanja CD2 i CD45RC molekula, u okviru subpopulacije CD4-CD8- ćelija sa nemerljivom površinskom gustinom TCR $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$ -), koja je dobijena iz suspenzija timocita koji su sveže izolovani iz timusa odraslih mužjaka pacova neorhidektomisanih (NEORH) i orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR). CD4-CD8- ćelije su izdvojene magnetnim uklanjanjem (engl. magnetic activated cell sorting, MACS) CD4+ i CD8+ ćelija iz suspenzije ukupnih timocita.

D, E, F. Histogrami prikazuju apsolutan broj (D) CD2-CD45RC+, (E) CD2+CD45RC+ i (F) CD2+CD45RC- timocita najnezrelijeg CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - fenotipa u timusu NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

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

4.7.3.2. TCR $\alpha\beta$ + timociti

U okviru subpopulacije timocita koji na svojoj površini ispoljavaju nizak nivo TCR $\alpha\beta$, davanje propranolola neorhidektomisanim pacovima je dovelo do statistički

značajnog ($p < 0.01$) smanjenja procenta kako DN, tako i DP ćelija, dok je relativna zastupljenost malih subpopulacija CD4-CD8⁺ i CD4-CD8⁺ JP timocita ostala nepromenjena (Slika 42).

Kao što je očekivano, s obzirom na nepromenjen ukupan broj timocita, tretman propranololom je doveo do statistički značajnog ($p < 0.01$) smanjenja apsolutnog broja DN TCR $\alpha\beta$ ⁺, te DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ timocita, ne utičući na brojnost nijedne od TCR $\alpha\beta$ ⁺ JP subpopulacija (Slika 43).

U odsustvu hormona testisa, uticaj propranolola na procenat DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ timocita je izostao [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=8.43$, $p=0.0095$], dok je efekat na procentualnu zastupljenost drugih subpopulacija TCR $\alpha\beta$ ⁺ ćelija ostao nepromenjen (Slika 42).

Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da je uticaj propranolola na smanjenje ukupnog broja DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ ćelija izostao u timusu orhidektomisanih pacova [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=10.61$, $p=0.0044$], dok je efekat tretmana na brojnost DN i JP TCR $\alpha\beta$ ⁺ ćelija ostao neizmenjen, u odnosu na neorhidektomisane životinje (Slika 43).

4.7.3.3. TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ timociti

Dugotrajan tretman propranololom, u prisustvu hormona testisa, je doveo do statistički značajnog ($p < 0.05$) povećanja procentualne zastupljenosti svih subpopulacija timocita koji se karakterišu visokom površinskom gustom TCR $\alpha\beta$ (Slika 42). Pored toga, u timusu životinja tretiranih propranololom došlo je i do značajnog ($p < 0.05$) porasta ukupnog broja TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ timocita svih fenotipova (Slika 43). Porast procenta CD4-CD8⁺ JP TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ timocita je bio znatno izraženiji (približno za 40%), u odnosu na povećanje relativne zastupljenosti CD4⁺CD8⁻ JP TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ ćelija (približno za 13%). U skladu sa navedenim nalazom, uočeno je i značajno ($p < 0.01$) pomeranje odnosa procentualne zastupljenosti najzrelijih JP TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ timocita ka ćelijama CD4-CD8⁺ JP TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ fenotipa.

Za razliku od neorhidektomisanih životinja, tretman orhidektomisanih pacova propranololom nije uticao ni na jedan od prethodno navedenih parametara. Sledstveno, dvofaktorska analiza varijanse je pokazala postojanje značajnih interakcija u delovanju orhidektomije i tretmana propranololom na procentualnu zastupljenost [DN,

F(1,20)=20.51, p=0.0002; CD4+CD8- JP, F(1,20)=11.97, p=0.0025; CD4-CD8+ JP, F(1,20)=12.67, p=0.0026; DP, F(1,20)=14.72, p=0.001] i ukupan broj [DN, F(1,20)=13.06, p=0.0017; CD4+CD8- JP, F(1,20)=74.19, p=0.0001; CD4-CD8+ JP, F(1,20)=6.23, p=0.0214; DP, F(1,20)=5.38, p=0.0339] svih subpopulacija TCR $\alpha\beta$ ++ timocita, kao i na odnos procentualne zastupljenosti najzrelijih CD4+CD8- i CD4-CD8+ JP TCR $\alpha\beta$ ++ ćelija [F(1,20)=4.63, p=0.0439] (Slika 42, 43).

4.7.4. Uticaj tretmana propranololom na selekciju timocita

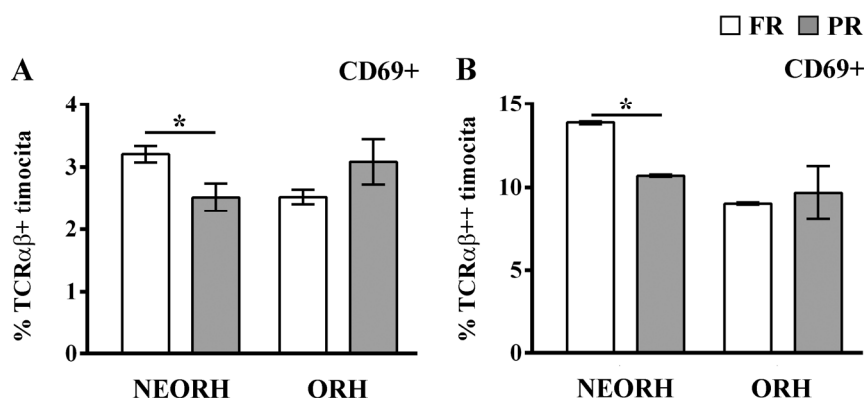
4.7.4.1. Uticaj tretmana propranololom na ispoljavanje CD69 antigena

Ispitivanje ispoljavaja markera pozitivne selekcije je pokazalo da, u suspenzijama timocita pacova koji su prethodno tretirani propranololom, dolazi do značajnog (p<0.05) smanjenja procenta CD69+ ćelija u okviru subpopulacija TCR $\alpha\beta$ + i TCR $\alpha\beta$ ++ timocita (Slika 45).

Kako su ovakvi efekti tretmana propranololom, kod pacova koji su prethodno bili orhidektomisani u uzrastu od 30 dana, izostali, pokazana je značajna interakcija u efektima orhidektomije i propranolola na procentualnu zastupljenost CD69+ ćelija u okviru subpopulacija TCR $\alpha\beta$ + [F(1,20)=8.16, p=0.0135] i TCR $\alpha\beta$ ++ [F(1,20)=5.65, p=0.0276] timocita (Slika 45).

4.7.4.2. Uticaj tretmana propranololom na ispoljavanje CD90 antigena

Istraživanja sprovedena na T-ćelijskim linijama su pokazala da dodavanje noradrenalina ili cAMP-a u kulturu ovih ćelija dovodi do smanjenja nivoa iRNK koja kodira CD90 molekul, kao i da se ovi efekti mogu sprečiti davanjem propranolola (Wajeman-Chao i sar., 1998). Imajući ovo u vidu, ispitan je uticaj dugotrajnog davanja propranolola na gustinu ispoljavanja CD90 molekula na membrani TCR $\alpha\beta$ + i TCR $\alpha\beta$ ++ timocita kod orhidektomisanih i neorhidektomisanih pacova.



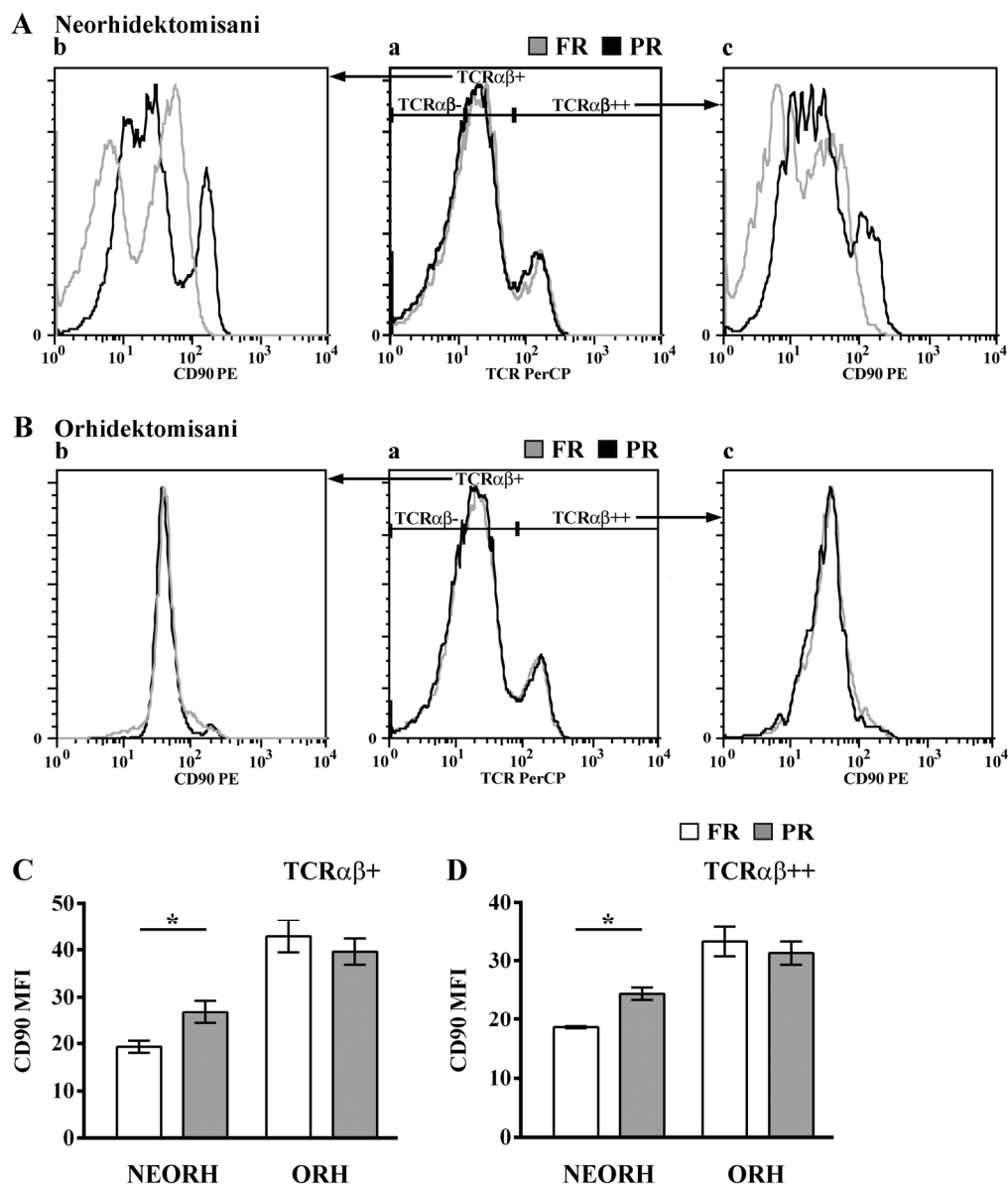
Slika 45. Uticaj četrnaestodnevnog tretmana propranololom na ispoljavanje CD69 molekula na membrani sveže izolovanih timocita neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A, B. Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost ćelija koje ispoljavaju CD69 molekul (CD69+) u okviru subpopulacija timocita sa **(A)** niskom ($TCR\alpha\beta+$) i **(B)** visokom ($TCR\alpha\beta++$) gustinom površinskog ispoljavanja $TCR\alpha\beta$ na membrani, u suspenzijama ćelija sveže izolovanih iz timusa odraslih mužjaka pacova neorhidektomisanih (NEORH) i orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR).

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

Tretman propranololom je doveo do značajnog povećanja ($p<0.05$) gustine ispoljavanja CD90 antigena, kako na membrani $TCR\alpha\beta+$ tako i na membrani $TCR\alpha\beta++$ timocita neorhidektomisanih pacova, u poređenju sa životinjama koje su primale fiziološki rastvor (Slika 46).

Sa druge strane, u uslovima nedostatka hormona testisa, prethodno opisani efekat propranolola na ispoljavanje CD90 molekula nije uočen ni u okviru subpopulacije $TCR\alpha\beta+$ [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=4.26$, $p=0.048$], a ni u okviru subpopulacije $TCR\alpha\beta++$ timocita [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=5.41$, $p=0.0307$] (Slika 46).



Slika 46. Uticaj četrnaestodnevno tretmana propranololom na ispoljavanje CD90 molekula na membrani sveže izolovanih timocita neorhizotomisanih i orhizotomisanih pacova.

A, B. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski histogrami prikazuju ispoljavanje CD90 molekula u okviru subpopulacija timocita sa **(b)** niskom ($TCR\alpha\beta+$) i **(c)** visokom ($TCR\alpha\beta++$) gustinom površinskog ispoljavanja $TCR\alpha\beta$ na membrani, izolovanih iz timusa odraslih mužjaka pacova **(A)** neorhizotomisanih (NEORH) i **(B)** orhizotomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) (crna linija) ili fiziološkim rastvorom (FR) (siva linija), koje su izdvajane kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima **(a)**.

C, D. Histogrami prikazuju srednji intenzitet fluorescencije (engl. mean fluorescence intensity, MFI) koju emituje PE vezan za antitelo protiv CD90 molekula, kojim su obeleženi timociti NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

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

4.7.5. Uticaj tretmana propranololom na proliferaciju i apoptozu timocita u okviru osnovnih subpopulacija ćelija, koje su razdvojene na osnovu ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora kod orhidektomisanih i neorhidektomisanih pacova

4.7.5.1. Uticaj tretmana propranololom na apoptozu timocita u okviru osnovnih subpopulacija

Statistički značajano ($p < 0.01$) povećanje procenta timocita u apoptozu je zabeleženo samo u okviru subpopulacije DP timocita neorhidektomisanih pacova koji su primali propranolol, dok je u okviru DN i obe subpopulacije JP ćelija taj procentat ostao nepromenjen (Slika 40).

Orhidektomija je dovela do drastičnog smanjenja efekta propranolola na apoptozu DP ćelija [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=15.06$, $p=0.0013$], ne menjajući efekat propranolola na apoptozu DN i JP subpopulacija timocita (Slika 40).

4.7.5.2. Uticaj tretmana propranololom na proliferaciju timocita u okviru osnovnih subpopulacija

Kod neorhidektomisanih životinja koje su tretirane propranololom je uočen značajan ($p < 0.05$) porast proliferacije DP i CD4-CD8+ JP ćelija. Procenat proliferišućih ćelija u okviru DN i CD4+CD8- subpopulacija je ostao nepromenjen kod životinja tretiranih propranololom (Slika 41).

Uticaj tretmana propranololom na proliferaciju ćelija koje pripadaju DP [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=6.38$, $p=0.0267$] i CD4-CD8+ JP [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=9.21$, $p=0.0084$] subpopulacijama je uočen samo kod neorhidektomisanih pacova. Sa druge strane, ni u prisustvu, ni u odsustvu hormona testisa, davanje propranolola nije uticalo na proliferaciju ćelija DN i CD4+CD8- JP fenotipa (Slika 41).

4.7.6. Uticaj tretmana propranololom na zastupljenost ćelija koje ispoljavaju regulatorni fenotip u timusu

S obzirom na to da je prethodno pokazano (Leposavić i sar., 2006), da davanje propranolola pacovima soja Wistar utiče na sazrevanje ćelija regulatornog fenotipa, ispitivan je uticaj tretmana propranololom i na sazrevanje ovih ćelija.

4.7.6.1. CD4+CD25+Foxp3+ ćelije

Dugotrajno davanje propranolola, u prisustvu hormona testisa, dovelo je do značajnog ($p < 0.01$) porasta procenta ćelija CD25+Foxp3+ fenotipa u okviru subpopulacije CD4+ timocita, i procenta CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u ukupnoj populaciji timocita (podaci nisu prikazani), uz istovremeno značajno ($p < 0.01$) povećanje ukupnog broja CD4+CD25+Foxp3+ ćelija kod ovih pacova (Slika 47).

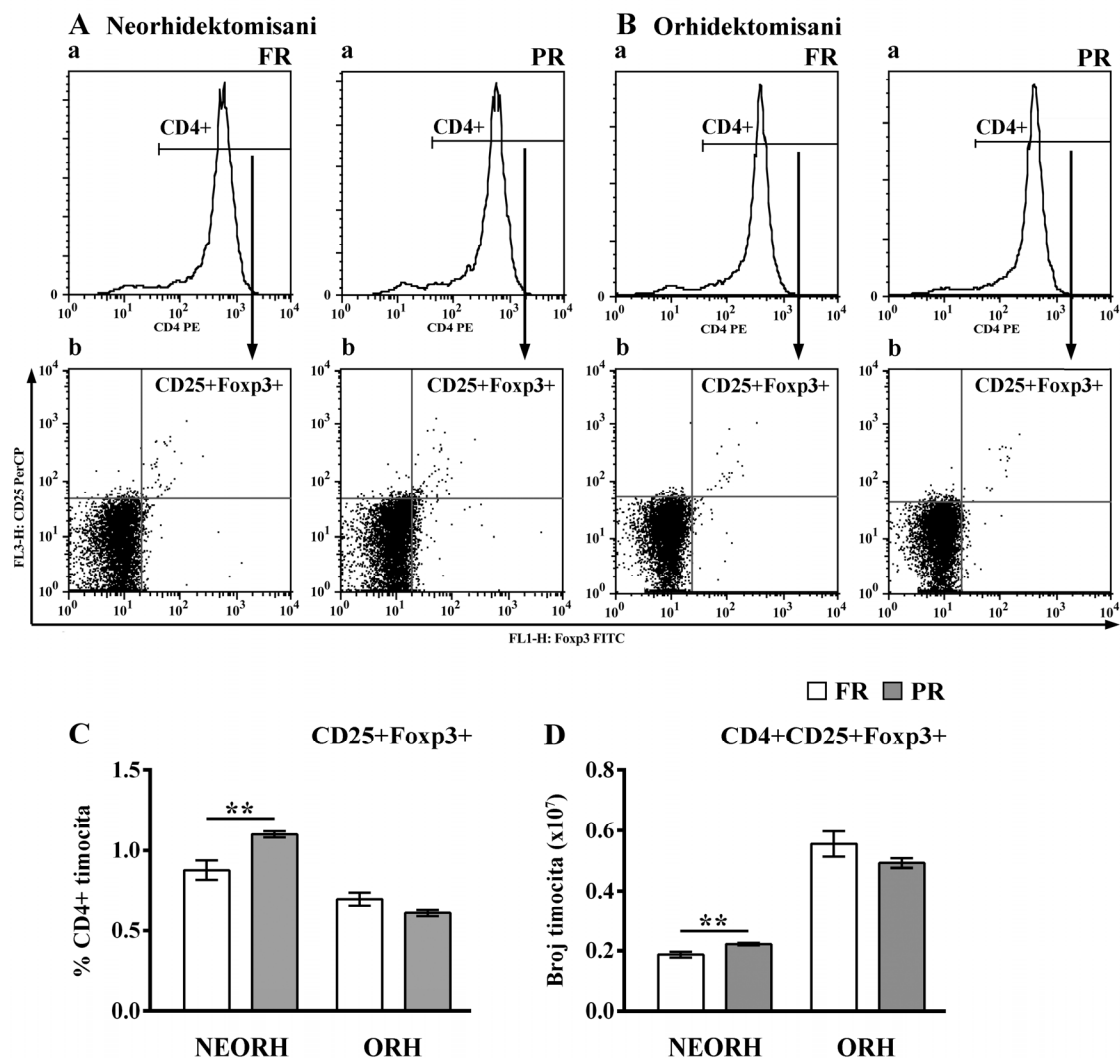
Nasuprot neorhidektomisanim pacovima, kod orhidektomisanih životinja propranolol nije uticao na procenat CD25+Foxp3+ ćelija unutar CD4+ subpopulacije [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=15.91$, $p=0.0008$], procenat CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u ukupnoj populaciji timocita [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=6.99$, $p=0.0156$] (podaci nisu prikazani), kao ni na apsolutan broj CD4+CD25+Foxp3+ timocita [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=7.71$, $p=0.0141$] (Slika 47).

4.7.6.2. CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelije

U timusima neorhidektomisanih životinja koje su primale propranolol, procenat CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u okviru subpopulacije CD8+ timocita, procenat CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u timocitnoj populaciji (podaci nisu prikazani), kao i ukupan broj ćelija sa CD8+ CD161+TCR $\alpha\beta$ + fenotipom, je bio značajno ($p < 0.05$) veći, u odnosu na kontrolne životinje (Slika 48).

Hirurško uklanjanje hormona testisa je, međutim, onemogućilo ovakvo delovanje propranolola na procenat CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ timocita [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=13.19$, $p=0.0017$], procenat CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u ukupnoj populaciji timocita [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=11.79$, $p=0.0026$] (podaci nisu prikazani), kao i na

ukupan broj [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=5.07$, $p=0.0388$] $CD8+CD161+TCR\alpha\beta+$ ćelija u timusu (Slika 48).

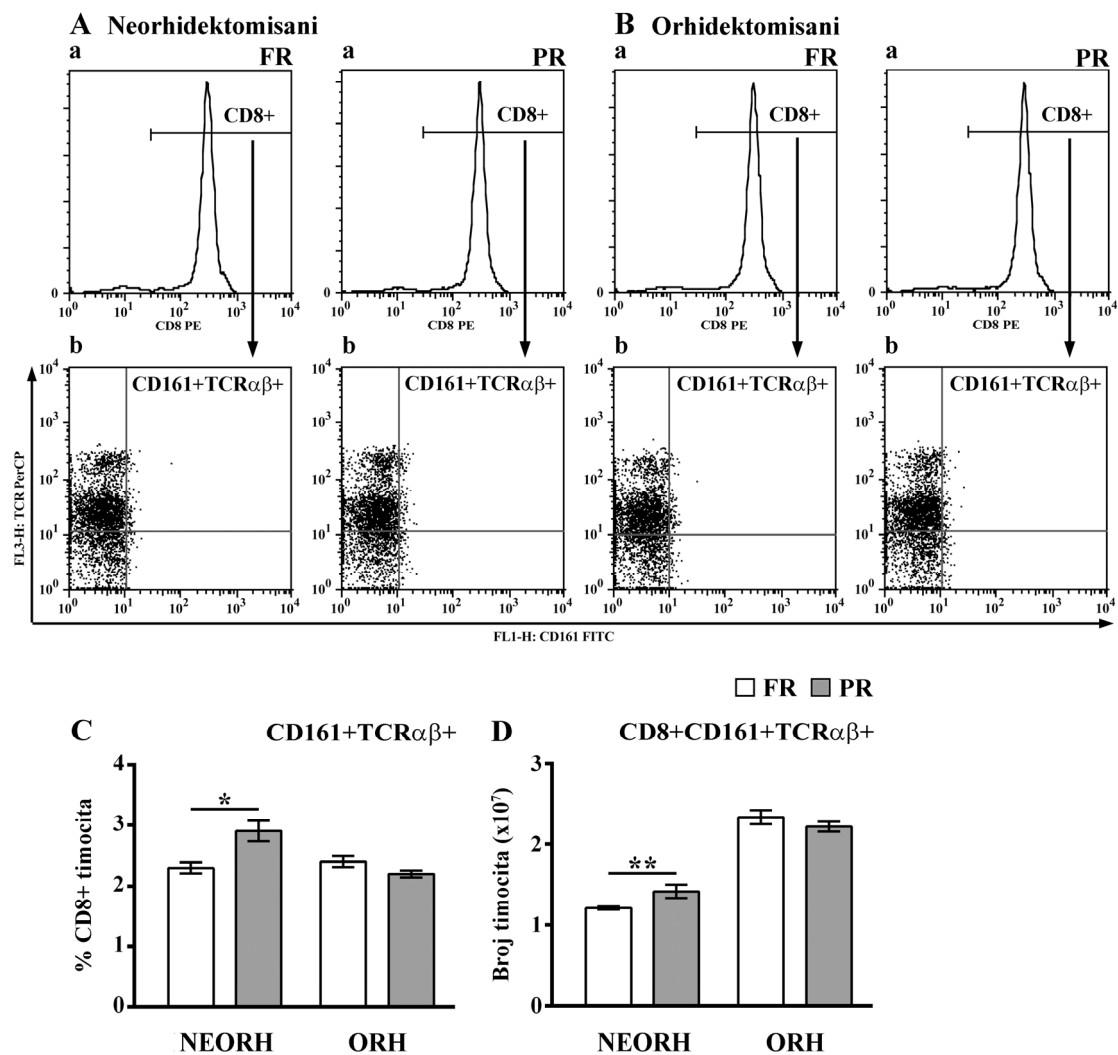


Slika 47. Uticaj četrnaestodnevno tretmana propranololom na procentualnu zastupljenost i apsolutan broj $CD4+CD25+Foxp3+$ ćelija u timusu neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A, B. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi (**b**) ilustruju ispoljavanje CD25 i Foxp3 molekula u subpopulaciji $CD4+$ timocita odraslih mužjaka pacova (**A**) neorhidektomisanih (NEORH) i (**B**) orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih (desno) propranololom (PR) ili (levo) fiziološkim rastvorom (FR), koja je izdvajana kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima (**a**).

C, D. Histogrami prikazuju (**C**) procentualnu zastupljenost $CD25+Foxp3+$ ćelija u okviru $CD4+$ subpopulacije timocita i (**D**) apsolutan broj $CD4+CD25+Foxp3+$ timocita u timusu NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

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



Slika 48. Uticaj četrnaestodnevog tretmana propranololom na procentualnu zastupljenost i apsolutan broj CD8+CD161+TCRαβ+ ćelija u timusu neorhizotomisanih i orhizotomisanih pacova.

A, B. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi (b) ilustruju ispoljavanje CD161 i TCRαβ molekula u subpopulaciji CD8+ timocita odraslih mužjaka pacova (A) neorhizotomisanih (NEORH) i (B) orhizotomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih (desno) propranololom (PR) ili (levo) fiziološkim rastvorom (FR), koja je izdvajana kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima (a).

C, D. Histogrami prikazuju (C) procentualnu zastupljenost CD161+TCRαβ+ ćelija u okviru CD8+ subpopulacije timocita i (D) apsolutan broj CD8+CD161+TCRαβ+ timocita u timusu NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. (n=6). * p<0.05; ** p<0.01.

4.8. UTICAJ TRETMANA PROPRANOLOLOM NA T-ĆELIJSKI ODELJAK PERIFERNE KRVI U PRISUSTVU I ODSUSTVU HORMONA TESTISA

4.8.1. Populacija T-ćelija

U perifernoj krvi pacova tretiranih propranololom, u prisustvu hormona testisa, izmeren je značajan porast ($p < 0.05$) procentualne zastupljenosti $TCR\alpha\beta^+$ limfocita, koji je bio praćen i odgovarajućim značajnim ($p < 0.05$) povećanjem apsolutnog broja ovih ćelija (Slika 49).

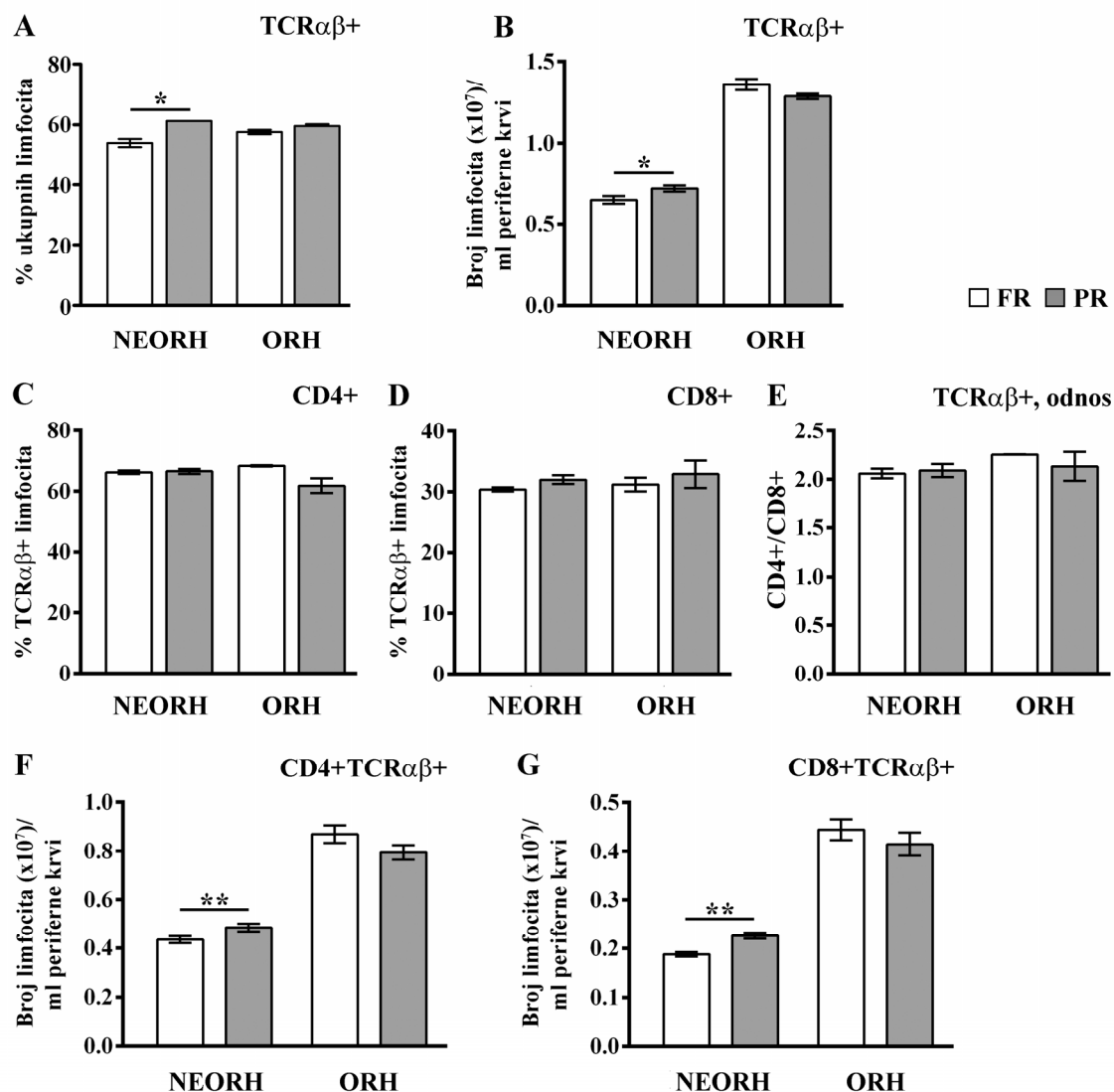
U odsustvu hormona testisa, efekti tretmana propranololom na relativnu zastupljenost [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=6.67$, $p=0.0194$], kao i na ukupan broj T-ćelija [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=9.15$, $p=0.007$] u perifernoj krvi pacova su izostali (Slika 49).

4.8.2. CD4+ i CD8+ subpopulacije T-limfocita

Davanje propranolola nije dovelo do statistički značajne promene procenta ni $CD4^+$ ni $CD8^+$ limfocita, u okviru populacije $TCR\alpha\beta^+$ ćelija periferne krvi neorhidektomisanih pacova, te, sledstveno, ni do promene odnosa procentualne zastupljenosti $CD4^+$ i $CD8^+$ T-ćelija (Slika 49).

Povećanje apsolutnog broja T-ćelija kod nekastriranih pacova tretiranih propranololom odražavalo je značajan ($p < 0.01$) porast ukupnog broja $CD4^+ TCR\alpha\beta^+$, te $CD8^+ TCR\alpha\beta^+$ ćelija u perifernoj krvi ovih životinja (Slika 49).

Slično neorhidektomisanim životinjama, davanje propranolola orhidektomisanim pacovima nije uticalo na procentualnu zastupljenost ni $CD4^+$ ćelija, ni $CD8^+$ ćelija u okviru T-ćelijske populacije periferne krvi (Slika 49) a, sledstveno, ni na odnos procentualne zastupljenosti ovih subpopulacija ćelija. S obzirom na to da tretman propranololom nije doveo do promene ukupnog broja $CD4^+ TCR\alpha\beta^+$ i $CD8^+ TCR\alpha\beta^+$ ćelija periferne krvi u odsustvu hormona testisa, dvofaktorska analiza varijanse je pokazala značajne orhidektomija x propranolol interakcije [$CD4^+ TCR\alpha\beta^+$, $F(1,20)=6.52$, $p=0.0206$; $CD8^+ TCR\alpha\beta^+$, $F(1,20)=4.57$, $p=0.0493$] (Slika 49).



Slika 49. Uticaj četrnaestodnevnog tretmana propranololom na zastupljenost CD4 i CD8 T-ćelija u perifernoj krvi neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A, B. Histogrami prikazuju (A) procentualnu zastupljenost i (B) broj T-limfocita (TCR $\alpha\beta$ + ćelija) u perifernoj krvi odraslih mužjaka pacova neorhidektomisanih (NEORH) i orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR).

C, D, E. Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost (C) CD4+ i (D) CD8+ ćelija, koje su razdvojene na osnovu gustine površinskog ispoljavanja CD4 i CD8 koreceptora na membrani, u okviru populacije T-limfocita, kao i (E) odnos procentualne zastupljenosti CD4+/CD8+ limfocita u okviru populacije T-ćelija u perifernoj krvi NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

F, G. Histogrami prikazuju ukupan broj (F) CD4+ i (G) CD8+ T-limfocita perifernoj krvi NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

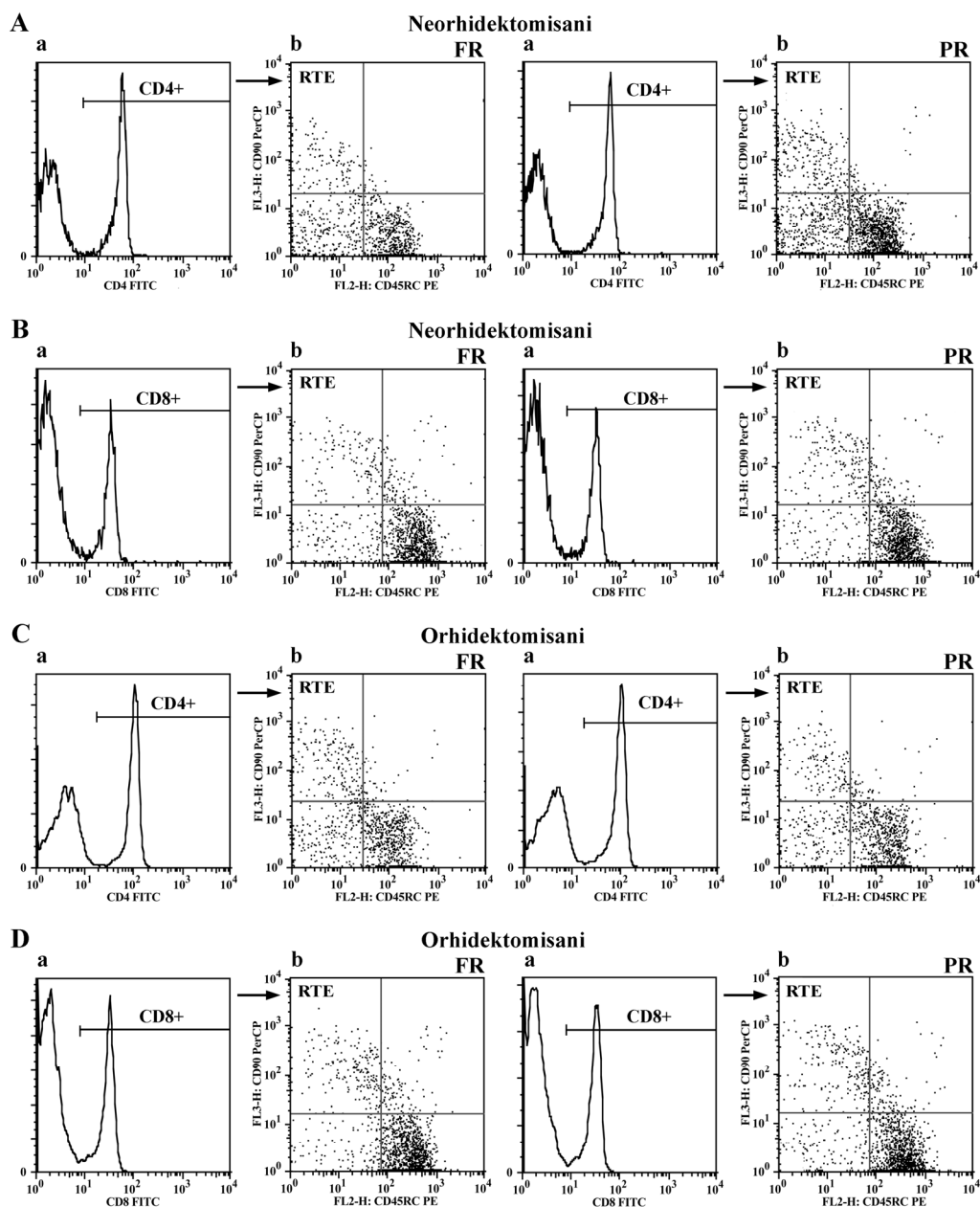
Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. (n=6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.8.3. CD4+ i CD8+ sveži timusni emigranti

U skladu sa povećanjem procenta najzrelijih CD4+CD8- i CD4-CD8+ JP TCR $\alpha\beta$ ++ timocita, kod životinja tretiranih propranololom nađeno je i značajno ($p < 0.05$) povećanje procenta CD90+CD45RC- svežih timusnih emigranata, kako u okviru CD4+, tako i CD8+ subpopulacije T-ćelija periferne krvi (Slika 50, 51). Smanjenje odnosa procentualne zastupljenosti CD4+CD8- i CD4-CD8+ JP TCR $\alpha\beta$ ++ timocita kod ovih životinja je dovelo i do značajnog ($p < 0.05$) smanjenja odnosa procentualne zastupljenosti CD4+CD90+CD45RC- i CD8+CD90+CD45RC- svežih timusnih emigranata u T-ćelijskom odeljku periferne krvi (Slika 50, 51).

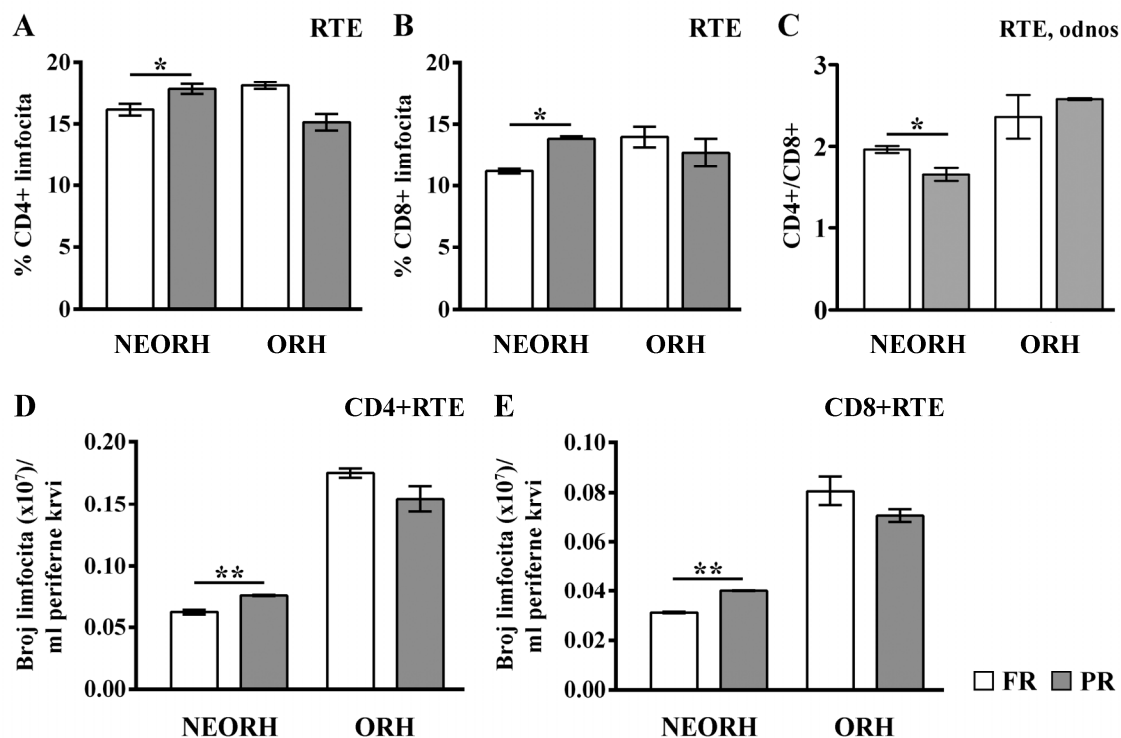
Kod nekastriranih životinja tretiranih propranololom, nađeno je značajno ($p < 0.01$) povećanje ukupnog broja svežih timusnih emigranata oba fenotipa (Slika 50, 51), u poređenju sa kontrolnim životinjama kojima je davan fiziološki rastvor.

Svi prethodno opisani efekti propranolola su uočeni isključivo kod neorhidektomisanih životinja, pa su dvofaktorskom analizom pokazane značajne interakcije u delovanju orhidektomije i propranolola na: procentualnu zastupljenost svežih timusnih emigranata [interakcija orhidektomija x propranolol: CD90+CD45RC- u okviru populacije CD4+ T-ćelija, $F(1,20)=21.23$, $p=0.0003$; CD90+CD45RC- u okviru populacije CD8+ T-ćelija, $F(1,20)=4.49$, $p=0.05$], odgovarajući odnos procentualnih zastupljenosti CD4+ i CD8+ ćelija ovog fenotipa [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=6.67$, $p=0.0194$] i, konačno, na njihov ukupan broj [orhidektomija x propranolol interakcija: CD4+CD90+CD45RC-, $F(1,20)=12.34$, $p=0.0031$; CD8+CD90+CD45RC-, $F(1,20)=5.09$, $p=0.042$] (Slika 50, 51).



Slika 50. Protočno citofluorimetrijska analiza uticaja četrnaestodnevnog tretmana propranololom na zastupljenost CD4+ i CD8+ svežih timusnih emigranata u perifernoj krvi neorhizektomisanih i orhizektomisanih pacova.

A, B, C, D. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi **(b)** ilustruju izdvajanje CD90+CD45RC- svežih timusnih emigranata (engl. recent thymic emigrants, RTE) u okviru **(A, C)** CD4+ i **(B, D)** CD8+ subpopulacija T-limfocita (TCR $\alpha\beta$ + ćelija) periferne krvi odraslih mužjaka pacova **(A, B)** neorhizektomisanih i **(C, D)** orhizektomisanih u uzrastu od 30 dana, tretiranih (desno) propranololom (PR) ili (levo) fiziološkim rastvorom (FR), koje su izdvajane kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima **(a)**. Suspenzije T-limfocita su dobijene magnetnim izdvajanjem (engl. magnetic activated cell sorting, MACS) TCR $\alpha\beta$ + ćelija iz suspenzija ukupnih limfocita periferne krvi.



Slika 51. Uticaj četrnaestodnevnog tretmana propranololom na zastupljenost CD4+ i CD8+ svežih timusnih emigranata u perifernoj krvi neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

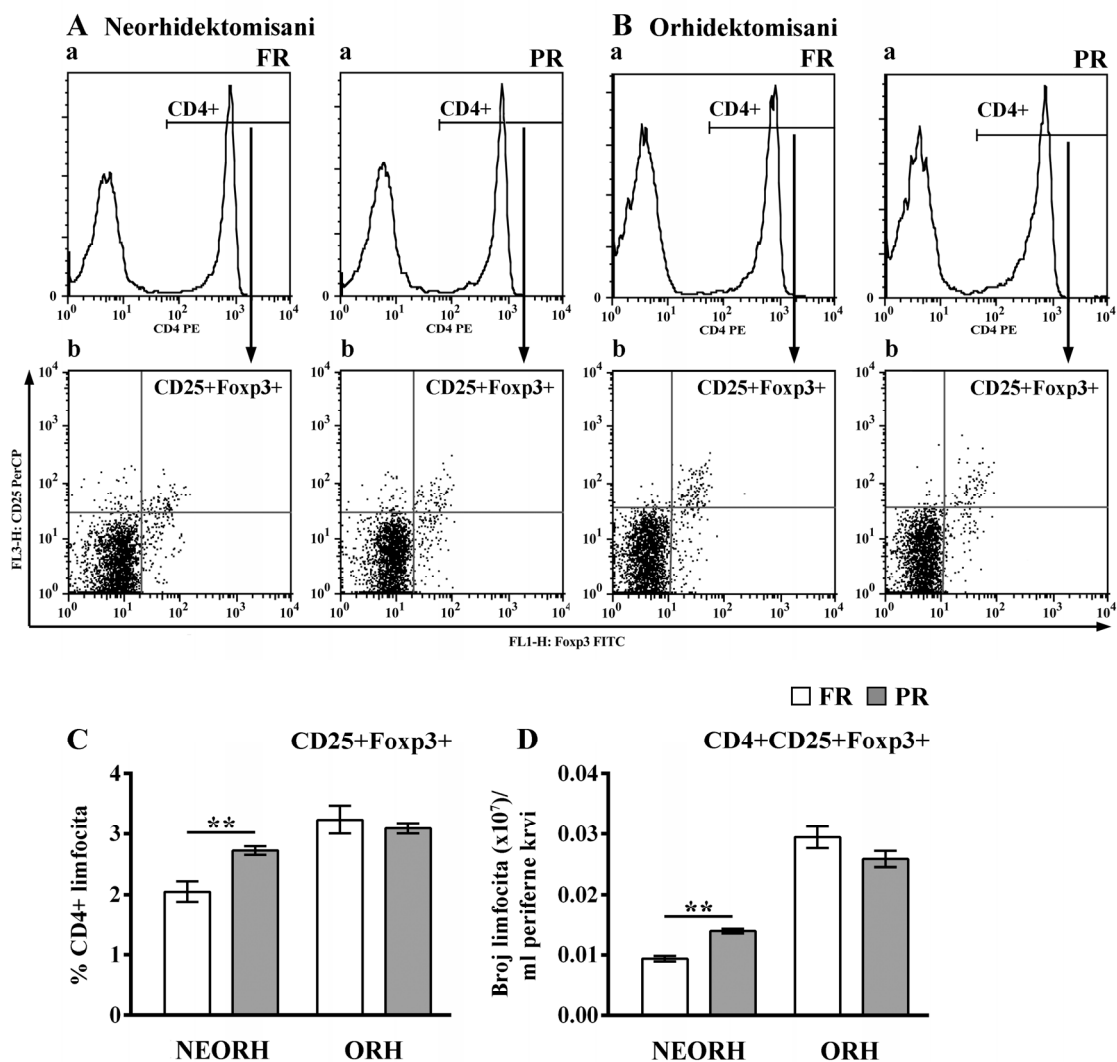
A, B, C. Histogrami prikazuju procentualnu zastupljenost svežih timusnih emigranata u okviru (A) CD4+ i (B) CD8+ subpopulacija T-ćelija, kao i (C) odnos procentualne zastupljenosti CD4+/CD8+ svežih timusnih emigranata (engl., recent thymic emigrants, RTE) u okviru populacije T-ćelija periferne krvi odraslih mužjaka pacova neorhidektomisanih (NEORH) i orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih propranololom (PR) ili fiziološkim rastvorom (FR).

D, E. Histogrami prikazuju ukupan broj (D) CD4+ i (E) CD8+ svežih timusnih emigranata u perifernoj krvi NEORH i ORH pacova, koji suprimali PR ili FR.

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. (n=6). * p<0.05; ** p<0.01.

4.8.4. CD4+CD25+Foxp3+ Treg ćelije

Značajno povećanje (p<0.01) procenta CD25+Foxp3+ T regulatornih ćelija u okviru CD4+ subpopulacije limfocita periferne krvi, koje je bilo praćeno i odgovarajućim značajnim (p<0.01) porastom ukupnog broja CD4+CD25+Foxp3+ ćelija, odgovaralo je promenama brojnosti ćelija CD4+CD25+Foxp3+ fenotipa u timusu neorhidektomisanih pacova koji su bili podvrgnuti tretmanu propranololom (Slika 52).



Slika 52. Uticaj četrnaestodnevog tretmana propranololom na procentualnu zastupljenost i apsolutan broj CD4+CD25+Foxp3+ prirodnih regulatornih ćelija u perifernoj krvi neorhizektomisanih i orhizektomisanih pacova.

A, B. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi (b) ilustruju ispoljavanje CD25 i Foxp3 molekula u subpopulaciji CD4+ limfocita periferne krvi odraslih mužjaka pacova (A) neorhizektomisanih (NEORH) i (B) orhizektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih (desno) propranololom (PR) ili (levo) fiziološkim rastvorom (FR), koja je izdvajana kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima (a).

C, D. Histogrami prikazuju (C) procentualnu zastupljenost CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ subpopulacije limfocita i (D) apsolutan broj CD4+CD25+Foxp3+ limfocita u perifernoj krvi NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

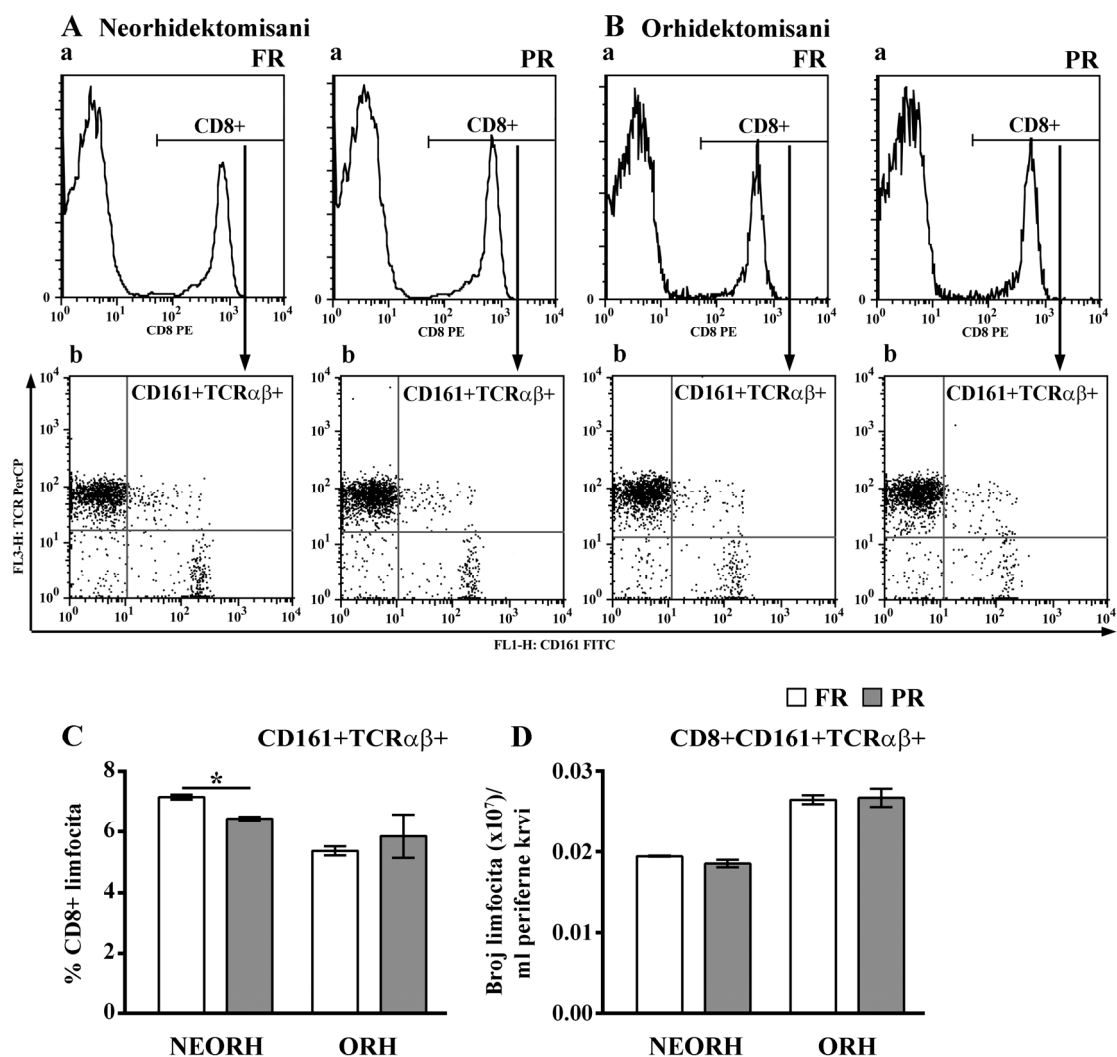
Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. (n=6). ** p<0.01.

Kod orhidektomisanih pacova, za razliku od neorhidektomisanih životinja, davanje propranolola nije uticalo na procentualnu zastupljenosti CD25+Foxp3+ ćelija u okviru CD4+ subpopulacije limfocita [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=7.6$, $p=0.0113$], kao ni na ukupan broj CD4+CD25+Foxp3+ ćelija [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=13.97$, $p=0.0013$] u perifernoj krvi (Slika 52).

4.8.5. CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + NKT ćelije

Uprkos povećanju procenta i ukupnog broja CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u timusu lažno operisanih pacova tretiranih propranololom, procenat CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u okviru subpopulacije CD8+ ćelija periferne krvi istih životinja bio je značajno ($p<0.05$) manji, u poređenju sa kontrolnim životinjama koje su primale fiziološki rastvor (Slika 53). Ukupan broj CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + limfocita u perifernoj krvi nije bio statistički značajno promenjen usled delovanja propranolola.

Uklanjanje testisa je učinilo neefikasnim [orhidektomija x propranolol interakcija, $F(1,20)=10.42$, $p=0.0051$] delovanje propranolola na procentualnu zastupljenost CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija, u okviru subpopulacije CD8+ limfocita (Slika 53). Tretman propranololom nije uticao na ukupan broj CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u perifernoj krvi, nezavisno od prisustva hormona testisa (Slika 53).



Slika 53. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na procentualnu zastupljenost i apsolutan broj CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + urodenoubilačkih T regulatornih ćelija u perifernoj krvi neorhidektomisanih i orhidektomisanih pacova.

A, B. Reprezentativni protočno citofluorimetrijski tačkasti prikazi (**b**) ilustruju ispoljavanje CD161 i TCR $\alpha\beta$ molekula u subpopulaciji CD8+ limfocita periferne krvi odraslih mužjaka pacova (**A**) neorhidektomisanih (NEORH) i (**B**) orhidektomisanih (ORH) u uzrastu od 30 dana, tretiranih (desno) propranololom (PR) ili (levo) fiziološkim rastvorom (FR), koja je izdvajana kao što je prikazano na protočno citofluorimetrijskim histogramima (**a**).

C, D. Histogrami prikazuju (**C**) procentualnu zastupljenost CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u okviru CD8+ subpopulacije limfocita i (**D**) apsolutan broj CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + limfocita u perifernoj krvi NEORH i ORH pacova, koji su primali PR ili FR.

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

5. DISKUSIJA

Rezultati dobijeni u okviru istraživanja vezanih za ovu doktorsku disertaciju su pokazali da: 1) i timociti i ćelije strome timusa sintetišu i sadrže merljive koncentracije kateholamina, kao i da ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor i 2) da hormoni testisa, modulišući sintezu kateholamina i ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu, utiču na efikasnost modulatornog delovanja ovih hormona/neurotransmitera na timopoezu. Drugim rečima, dobijeni nalazi sugerišu da se u timusu, kao i u nekim drugim tkivima (Wilson i Davies, 2007), kateholamini mogu posmatrati kao medijatori delovanja hormona testisa.

5.1. Sinteza kateholamina u timocitima i ćelijama strome timusa pacova

Ova studija je pokazala da, kod odraslih pacova, i nezreli T-limfociti sadrže merljivu količinu noradrenalina. Sa druge strane, u timocitima odraslih pacova dopamin je bio prisutan u niskim, detektabilnim, ali ne pouzdano merljivim koncentracijama HPLC metodom. Ovaj nalaz je u skladu sa podacima koji pokazuju da je u ćelijama imunskog sistema ukupan sadržaj kateholamina određen, pre svega, sadržajem noradrenalina (57-95%) u njima (Cosentino i sar., 2000). S obzirom na postojanje mehanizma za aktivno preuzimanje monoamina iz okruženja u limfocitima (Faraj i sar., 1991), ispitano je da li timociti pacova imaju sposobnost *de novo* sinteze kateholamina. Nalaz TH u timocitima je jasno pokazao da dopamin/noradrenalin u timocitima pacova, bar delom, potiče od sinteze u ovim ćelijama. Pokazano je da se imunoreaktivna TH nalazi uglavnom u timocitima najzrelijeg CD3⁺⁺ fenotipa. Ove ćelije su lokalizovane u nivou medularne strane KMS. Prisustvo TH je detektovano i u timocitima nezrelijeg CD3⁺ i CD3⁻ fenotipa, koji su smešteni supkapsularno i intrakortikalno. Dobijeni nalazi su u saglasnosti sa podacima o ekspresiji TH u mišjim timocitima (Qiu i sar., 2004), kao i onima o sintezi kateholamina u humanim hematopoetskim ćelijskim linijama, uključujući i T-ćelijsku liniju (Cosentino i sar., 2000). Pored toga, podaci da limfociti sintetišu noradrenalin, koristeći L-tirozin i L-DOPA kao prekursore, te da je njegovu sintezu u ovim ćelijama moguće blokirati primenom benzerazida i disulfirama, ukazuju da se kateholamini u limfocitima sintetišu iz istih prekursora i uz učešće istih enzima kao u nervnim ćelijama (Musso i sar., 1996). Dakle, prisustvo merljivih količina iRNK za TH i za DBH dodatno potvrđuje pretpostavku da timociti sintetišu noradrenalin.

Objašnjenje za nizak nivo dopamina u timocitima bi moglo da se nađe u činjenici da je brzina otpuštanja dopamina iz limfocita znatno veća u poređenju sa brzinom sekrecije noradrenalina, dok za sintezu ovih biološki aktivnih jedinjenja važi obrnut odnos (Qiu i sar., 2005).

Imunocitohemijski, prisustvo TH je pokazano i u ćelijama strome timusa, sa prostornom organizacijom koja odgovara onoj koju pokazuju TH+ timociti. Na osnovu veličine i morfoloških karakteristika, TH+ ćelije strome timusa su uglavnom činile TEC. Naknadna ispitivanja koja su obuhvatila imunocitohemijsko bojenje izolovanih TEC, uključujući timusne ćelije „dadilje“ i TEC koje formiraju rozete sa timocitima, su pokazala da ove ćelije ispoljavaju TH (Pilipović i sar., 2008). Imajući u vidu prisustvo u timusu ćelija koje ispoljavaju karakteristike neuroendokrinih ćelija i imaju zajedničko embrionalno poreklo sa ćelijama glije (Mentlein i Kendall, 2000; Botham i sar., 2001), ovaj nalaz nije bio iznenađujući. U prilog ovom nalazu idu i podaci da je u fragmentima timusa koji su presađivani pod kapsulu bubrega pacova uočeno prisustvo ćelija koje su, uz citokeratine karakteristične za epitelne ćelije, ispoljavale i antigene tipične za ćelije glije i neurone, poput TH i L1 adhezivnog molekula (Jones i sar., 1998). Daljim ispitivanjem je pokazano da ćelije kortikalne (R-TNC 1) i medularne (TE-R 2.5) linije, gajene u kulturi, ne ispoljavaju detektabilan nivo TH. Međutim, treba istaći da TEC, kako fenotipski tako i funkcijski, predstavljaju heterogenu populaciju ćelija (van de Wijngaert i sar., 1984). Ćelije R-TNC 1 linije odgovaraju cTEC tipa 2 ili 3, a ćelije TE-R 2.5 linije mTEC tipa 6. Sa druge strane, TH+ ćelije identifikovane na presecima timusa, prema distribuciji, najverovatnije, pripadaju TEC tipa 1 i 5 (van de Wijngaert i sar., 1984). Dakle, jedno od objašnjenja za odustvo specifičnog imunocitohemijskog bojenja, upotrebom antitela protiv TH, u timusnim ćelijskim linijama bi bilo da ćelije kortikalne (R-TNC 1) i medularne (TE-R 2.5) linije ne odgovaraju tipovima ćelija koje sintetizuju kateholamine u timusu. Kada su u pitanju timusne ćelije „dadilje“ (van de Wijngaert i sar., 1984), moguće je pretpostaviti da je pri gajenju u kulturi došlo do „gubitka“ ekspresije TH, usled nedostatka faktora rasta, poput faktora rasta epiderma, neophodnih za sticanje nervnog fenotipa (Screpanti i sar., 1995). Ovakva mogućnost postaje i verovatnija kada se uzme u obzir da bi jedna od funkcija timusnih ćelija poreklom od nervne kreste mogla biti upravo proizvodnja faktora rasta neophodnih za

razvoj nervnih elemenata (Mentlein i Kendall, 2000), ili usmeravanje sopstvenog razvoja ka nervnom fenotipu (Screpanti i sar., 1995).

Pored TEC, važnu komponentu strome timusa čine i MF i DC. Sudeći prema kolokalizaciji CD68 molekula i TH u ćelijama supkapsularnog korteksa i KMS timusa, subpopulacije MF u ovom organu takođe poseduju sposobnost sinteze kateholamina (Leposavić i sar., 2008b). Ovo je u skladu sa nalazima dobijenim ispitivanjem MF vantimusnog porekla, koji pokazuju da ovaj tip ćelija predstavlja značajan izvor kateholamina (Brown i sar., 2003), i da su ovi hormoni/neurotransmiteri uključeni u modulaciju aktivnosti MF autokrinim i/ili parakrinim načinom delovanja (Spengler i sar., 1994; Flierl i sar., 2007; 2009; Dimitrijević i sar., 2009).

U DC timusa pacova prisustvo TH nije detektovano, iako je nedavno pokazano da humane DC monocitnog porekla sintetišu i skladište dopamin, čije otpuštanje utiče na funkciju DC u polarizovanju imunskog odgovora (Nakano i sar., 2009).

5.2. Ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timocitima i ćelijama strome timusa pacova

Autoradiografskom analizom *in vitro* (Marchetti i sar., 1990a, b) je pokazano prisustvo β_2 -adrenergičkog receptora u timusu pacova. S obzirom na ove rezultate, nalaz β_2 -adrenergičkog receptora u limfoidnom i nelimfoidnom odeljku timusa pacova bio je očekivan. Iako je i prethodno pokazano da timociti pacova (Kubera i sar., 1992) i miša (Singh i sar., 1979; Loveland i sar., 1981; Fuchs i sar., 1988) ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor, rezultati ovog istraživanja su pokazali da zapravo samo mali broj timocita ispoljava β_2 -adrenergički receptor. Ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timocitima potvrđeno je na nivou iRNK i proteina. Timociti koji ispoljavaju ovaj receptor su raspoređeni kroz čitav korteks, sa nešto gušćom distribucijom u predelu KMS, a samo retko se uočavaju u meduli. Ovakav nalaz podržava koncept razvojne regulacije ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora na T-limfocitima, prema kojem je gustina receptora jako niska na površini najnezrelijih timocita i povećava se sa sazrevanjem ovih ćelija, tako da je njegova gustina na površini najzrelijih timocita uporediva sa onom na površini zrelih T-ćelija (Fuchs i sar., 1988; Staehelin i sar., 1985). Imajući u vidu podatke koji ukazuju da kateholamini, generalno, ostvaruju inhibitorni uticaj na

sazrevanje timocita, promena gustine β_2 -adrenergičkog receptora tokom sazrevanja bi trebalo da timocitima omogući veću efikasnost timopoeze (Kohm i Sanders, 2001).

Imunocitohemijskim ispitivanjem pokazano je prisustvo β_2 -adrenergičkog receptora i na ćelijama timusnog epitela. Ovaj nalaz je u skladu sa podacima koji ukazuju da kateholamini, posredstvom β -adrenergičkih receptora, utiču na proliferaciju i sekreciju TEC u kulturi (Kurz i sar., 1997; von Patay i sar., 1998).

Osim toga, slično alveolarnim MF (Butchers i sar., 1991), i onima u peritoneumu (Kiyoteru, 1977), dvostrukim imunocitohemijskim bojenjem pokazano je da subpopulacija ćelija strome timusa, koja ispoljava CD68 antigen, ispoljava i β_2 -adrenergički receptor. Ovakve ćelije su uočene u supkapsularnom i kortiko-medularnom regionu timusa.

Ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora nije uočeno na timusnim ćelijama „niske gustine“, koje pokazuju morfološke karakteristike DC (podaci nisu prikazani), sugerišući da DC u ovom organu odraslih mužjaka pacova nisu podložne modulatomnom delovanju kateholamina, posredstvom β_2 -adrenergičkog receptora. Za razliku od nalaza dobijenog kod pacova, podaci dobijeni funkcijskim ispitivanjima *in vitro* su pokazali da primena agonista β_2 -adrenergičkog receptora utiče na produkciju citokina u stimulisanim DC izolovanim iz humane periferne krvi (Panina-Bordignon i sar., 1997), kao i u DC izolovanim iz kostne srži miša (Kim i Jones, 2010).

5.3. Uticaj orhidektomije na koncentraciju noradrenalina u timusu odraslih pacova

Smanjenje koncentracije noradrenalina u timusu orhidektomisanih pacova, bilo je moguće povezati sa smanjenjem gustine noradrenergičkih nervnih vlakana i ćelija koje sintetišu ovaj neurotransmiter/hormon u samom organu i/ili smanjenim nivoom hormona poreklom iz srži nadbubrežne žlezde, koji krvotokom dospeva do timusa. Utvrđeno je da kod pacova kastracija ne dovodi do značajnih promena u nivou noradrenalina, ekspresiji gena za TH, niti u aktivnosti ovog enzima u srži nadbubrežne žlezde (Kumai i sar., 1995). Shodno ovom nalazu, opravdano se može zaključiti da su promene u koncentraciji noradrenalina u timusu orhidektomisanih pacova prevashodno posledica promena u samom organu. Ispitivanje je pokazalo da u timusu orhidektomisanih pacova, zaista, dolazi do smanjenja gustine fluorescentnih nervnih vlakana. Budući da je pokazano da testosteron određuje broj neurona u simpatičkim

ganglionima glodara (Suzuki i sar., 1982; Wright i Smolen, 1983), prethodni nalaz se može povezati sa nedostatkom hormona testisa. Međutim, smanjen intenzitet fluorescence u nervnim vlaknima je jasno pokazao da je nakon orhidektomije, najverovatnije, došlo i do smanjenja sadržaja noradrenalina u ovim vlaknima. S obzirom na podatke koji ukazuju da kastracija dovodi do smanjenja ekspresije iRNK za TH, kao i samog proteina u hipogastričnom ganglionu i to direktno srazmerno dužini deprivacije (Goldstein i sar., 1992), moglo se pretpostaviti da je do smanjenja sadržaja noradrenalina u nervnim vlaknima timusa orhidektomisanih životinja dovelo smanjenje ekspresije TH. U skladu sa ovom pretpostavkom, nađeno je smanjenje sadržaja iRNK koja kodira TH u timusu orhidektomisanih životinja. U prilog ovom nalazu može se navesti i podatak da testosteron, vezujući se za receptor za androgene, direktno stimuliše ekspresiju gena za TH (Jeong i sar., 2006). Iako se, generalno, TH smatra ključnim enzimom u biosintezi kateholamina, postoje i nalazi koji ukazuju da se, u nekim okolnostima, i regulacijom aktivnosti DBH, koja katalizuje poslednji korak u biosintezi noradrenalina, može ostvariti uticaj na sintezu kateholamina (Bustamante i sar., 1989). Direktnije, pokazano je da u vas deferensu kastriranih pacova dolazi do smanjenja sadržaja noradrenalina, koje se, pre svega, povezuje sa smanjenom aktivnošću DBH (Bustamante i sar., 1989). U skladu sa ovim nalazom, smanjena ekspresija DBH, pokazana u tkivu timusa orhidektomisanih pacova je, takođe, mogla doprineti smanjenju sadržaja noradrenalina u timusnim noradrenergičkim vlaknima.

Za razliku od noradrenergičkih nervnih vlakana, sadržaj noradrenalina u timocitima orhidektomisanih životinja je bio povećan. U ovim ćelijama je detektovana i povećana ekspresija iRNK za TH, kao i povećanje sadržaja proteina kodiranog ovim genom. Na prvi pogled, uočena promena nije u skladu sa prethodno iznetim podacima o stimulatornom delovanju testosterona na ekspresiju gena koji kodira TH. Potrebno je, međutim, imati u vidu da se regulacija TH ostvaruje velikim brojem različitih mehanizama, na način koji je karakterističan ne samo za životinjsku vrstu, već može biti bitno drugačiji zavisno od stadijuma razvoja, tkiva i tipa ćelije (Lenartowski i Goc, 2011). Smatra se da isti regulatorni faktori ostvaruju različite modulatorne efekte na aktivnost TH i biosintezu kateholamina, zavisno od tipa ćelije (Kumer i Vrana, 1996; Lenartowski i Goc, 2011). U skladu sa ovim, pokazano je da orhidektomija može dovesti i do povećanja ekspresije TH u pojedinim regionima mozga mužjaka pacova

(Selmanoff i sar., 1991). Za razliku od ekspresije TH, smanjenje ekspresije gena za DBH u tkivu timusa bi moglo, bar delom, biti posledica manje ekspresije ovog gena u timocitima orhidektomisanih životinja. Povećanju sadržaja noradrenalina u timocitima orhidektomisanih pacova, najverovatnije, je doprinelo i smanjenje ekspresije MAO-A, enzima koji je uključen u oksidativnu deaminaciju monoaminskih neurotransmitera (Johnston, 1968). Ovaj nalaz je u skladu sa podacima da androgeni povećavaju aktivnost MAO u mozgu pacova (Luine i sar., 1975), i stimulišu ekspresiju odgovarajućeg gena koji kodira MAO-A u humanim ćelijskim linijama (Ou i sar., 2006).

Konačno, orhidektomija je dovela do smanjenja gustine ćelija strome timusa koje sadrže i sintetišu kateholamine na presecima timusa, kao i sadržaja kateholamina u njima. Imajući u vidu da je za optimalnu proliferaciju TEC neophodno prisustvo androgena (Sakabe i sar., 1994), može se pretpostaviti da je uklanjanje hormona testisa dovelo do smanjenja proliferacije TEC, uključujući i one koje sadrže i sintetišu kateholamine, pa, sledstveno, i do smanjenja njihove numeričke gustine.

5.4. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu odraslih pacova

Podaci koji direktno definišu uticaj muških polnih hormona na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu su izuzetno oskudni. Imajući u vidu da kateholamini većinu efekata u timusu ostvaruju posredstvom ovog tipa receptora, naredni korak istraživanja bio je posvećen ispitivanju uticaja orhidektomije na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu. Ova studija je pokazala da, u odsustvu hormona testisa, dolazi do smanjenja gustine β_2 -adrenergičkog receptora na membrani timocita i količine iRNK za β_2 -adrenergički receptor po ćeliji strome timusa, što je u skladu sa brojnim podacima koji ukazuju na stimulatorno delovanje hormona testisa na ispoljavanje ovog tipa receptora u različitim tkivima, odnosno tipovima ćelija (Petrovic i sar., 1983; Shima, 1992; DiGiovanni i sar., 1992), uključujući i miocite pacova (Sun i sar., 2011). Poslednji nalaz je izuzetno značajan, imajući u vidu sličnost u biohemijskim i farmakološkim osobinama humanih β_2 -adrenergičkih receptora limfocita i srca, pri čemu je direktnim poređenjem pokazano da promene u gustini ovog receptora na membrani limfocita značajno koreliraju sa promenama njegove gustine u srcu (Brodde i

sar., 1989). Smanjenje količine iRNK za β_2 -adrenergički receptor u timusu je bilo izraženije (približno za 55%), u odnosu na ono izmereno u sveže izolovanim timocitima orhidektomisanih životinja (približno za 24%). Ovi podaci, u svetlu istovremenog povećanja numeričke gustine ćelija strome koje ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor, sugerišu smanjeno ispoljavanje iRNK za ovaj receptor na nivou pojedinačnih ćelija strome timusa usled uklanjanja hormona testisa. Imajući u vidu prethodno navedene podatke o uticaju ženskih polnih hormona na ispoljavanje β -adrenergičkih receptora u timusu (Marchetti i sar., 1990a; 1994), moguće je pretpostaviti da su neki od efekata kastracije posledica smanjene konverzije testosterona u estrogen (Olsen i Kovacs, 2011). Smanjena zastupljenost limfoidnih i ćelija strome koje na svojoj površini ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor odgovara saznanjima dobijenim autoradiografskim ispitivanjima uticaja promena u koncentraciji polnih steroida u cirkulaciji na histotopografsku distribuciju ovog receptora u timusu (Marchetti i sar., 1990a).

5.5. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na koncentraciju noradrenalina u timusu odraslih pacova u prisustvu i odsustvu hormona testisa

Danas je poznato da TH podleže svim poznatim oblicima regulacije aktivnosti enzima, uključujući transkripcione i posttranslacione mehanizme (Kumer i Vrana, 1996). Dugotrajna regulacija ekspresije gena koji kodira ovaj enzim se ostvaruje i posredstvom niza membranskih receptora i različitih signalnih puteva i sekundarnih glasnika (Flatmark, 2000). Utvrđeno je da cAMP, delujući na cAMP-vezujući element (engl. cAMP response element), igra važnu ulogu u regulaciji TH (Flatmark, 2000), stimulišući ekspresiju gena, sintezu i aktivnost enzima (Tank i sar., 1986; Lewis i sar., 1987; Melia i sar., 1992). Navedeni podaci sugerišu da bi tretman propranololom blokirajući β -adrenergičke receptore i smanjujući sintezu cAMP-a, mogao da dovede do nishodne regulacije ekspresije iRNK za TH i, posledično, sinteze noradrenalina. U skladu sa ovom pretpostavkom, nađeno je smanjenje sadržaja iRNK za TH i koncentracije noradrenalina u timusu neorhidektomisanih pacova tretiranih propranololom. Pored toga, budući da je pokazano da kateholamini, utičući na fosforilaciju TH, povećavaju aktivnost ovog enzima (Flatmark, 2000), može se pretpostaviti da tretman propranololom, smanjujući koncentraciju cAMP-a, smanjuje i aktivnost PKA (Meinkoth i sar., 1993) i sledstveno kompromituje fosforilaciju TH i

sintezu noradrenalina u timusu. Budući da tretman propranololom nije doveo do značajnih promena u ekspresiji iRNK za DBH i MAO-A, moglo se zaključiti da je smanjenje koncentracije noradrenalina u timusu pacova koji su primali propranolol posledica, pre svega, smanjene ekspresije, a, moguće, i aktivnosti TH. Pored toga, odsustvo promene u sadržaju iRNK za DBH i MAO-A u timusu pacova tretiranih propranololom sugerise da ekspresija gena za ove enzime u timusu nije regulisana delovanjem kateholamina posredstvom β -adrenergičkih receptora.

Davanje propranolola nije uticalo na gustinu noradrenergičkih nervnih vlakana, ali je dovelo do značajnog povećanja relativne zastupljenosti TH⁺ timocita, uz smanjenje sadržaja TH u njima. S obzirom na to da je pokazano da kateholamini sintetisani u limfocitima, delujući autokrino i/ili parakrino, izazivaju apoptozu i smanjuju proliferaciju ovih ćelija (Bergquist u sar., 1994; Bergquist i sar., 1998), moguće je pretpostaviti da u uslovima smanjene sinteze noradrenalina u timocitima i blokade β -adrenergičkih receptora, usled smanjene apoptoze i povećane proliferacije, dolazi do povećanja relativne brojnosti TH⁺ timocita. Smanjenje gustine TH⁺ ćelija strome timusa, kod životinja tretiranih propranololom, bi se moglo povezati sa podacima koji pokazuju da je ćelijama nervne kreste za ekspresiju TH i ispoljavanje fenotipa nervnih ćelija *in vitro* neophodna stimulacija β -adrenergičkih receptora i sinteza cAMP-a (Dupin i sar., 1993). Drugim rečima, smanjenje gustine TH⁺ ćelija strome timusa kod životinja tretiranih propranololom bi moglo biti posledica poremećaja u diferencijaciji TEC u uslovima blokade β -adrenergičkih receptora i smanjene sinteze cAMP-a.

Konačno, činjenica da tretman propranololom nije proizveo nijedan od opisanih efekata, u nedostatku hormona testisa, bi se najverovatnije mogla povezati sa nalazima koji pokazuju da hormoni koji deluju posredstvom jedarnih receptora (tiroidni hormoni, glukokortikoidi i polni hormoni), i koji se u anglosaksonskoj literaturi označavaju kao hormoni sa „permisivnim“ delovanjem, imaju izuzetno snažan uticaj na delovanje drugih hormona i neurotransmitera (Meier, 1997), uključujući i kateholamine.

5.6. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu odraslih pacova u prisustvu i odsustvu hormona testisa

Prema brojnim podacima iz literature, generalno, davanje agonista receptora spregnutih sa G-proteinima dovodi do nishodne regulacije ekspresije ovih receptora (Morris i Malbon, 1999). Ovaj fenomen je pokazan i u slučaju β -adrenergičkih receptora (Hadcock i sar., 1989a, b; Morris i Malbon, 1999). Pored toga, uočen je fenomen povećanja broja β -adrenergičkih receptora, kod ljudi i eksperimentalnih životinja, u odgovoru na primenu odgovarajućih antagonista (Aarons i sar., 1980; Wood i sar., 1982; Prichard i sar., 1983; Whyte i sar., 1987; Brodde i sar., 1990). Imajući u vidu prethodno iznete podatke, kao i činjenicu da je u timusu propranololom tretiranih životinja bio smanjen sadržaj iRNK za β_2 -adrenergički receptor (približno za 30%), ali mnogo više numerička gustina ćelija strome (približno za 50%) koje ispoljavaju ovaj receptor, dok je količina iRNK za β_2 -adrenergički receptor u timocitnoj frakciji timusnih ćelija bila nepromenjena, može se pretpostaviti da je količina iRNK za β_2 -adrenergički receptor i gustina ovih receptora po ćeliji timusne strome propranololom tretiranih životinja bila povećana. Ovo je u skladu sa podacima da propranolol povećava gustinu β_2 -adrenergičkog receptora na limfocitima, ćelijama srca i pluća pacova (Aarons i Molinoff, 1982), kao i u srcu i limfocitima čoveka (Brodde i sar., 1990). Kako stimulacija β -adrenergičkih receptora smanjuje bazalnu i stimulisanu proliferaciju TEC pacova (Kurz i sar., 1997), moguće je pretpostaviti da je kod životinja koje su dobijale propranolol, uprkos manjoj koncentraciji noradrenalina u mikrokruženju, usled povećanog ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora bila smanjena proliferacija i, posledično, gustina ovih ćelija. Slično, imajući u vidu da kateholamini smanjuju proliferaciju i povećavaju apoptozu MF (Brown i sar., 2003), smanjenju numeričke gustine ćelija strome timusa koje ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor su mogle doprineti i MF.

Za razliku od ćelija strome timusa, u timusu pacova koji su primali propranolol, došlo je do povećanja relativne brojnosti timocita koje ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor, uz smanjenje gustine receptora po ćeliji. U prilog ovom nalazu treba navesti, da nasuprot relativno velikom broju prethodno navedenih podataka da propranolol povećava gustinu β -adrenergičkih receptora (Aarons i Molinoff, 1982; Brodde i sar., 1990), postoje i podaci koji pokazuju suprotno, odnosno da davanje propranolola

smanjuje gustinu ovog tipa adrenergičkog receptora na plazma membrani. Hughes i saradnici (1988) su utvrdili da propranolol dovodi do smanjenja gustine β_2 -adrenergičkih receptora na membrani ćelija limfoma miša (S49), kao i da je ovaj efekat specifično vezan za β -adrenergički receptor (zavisi od prisustva α -subjedinice G_s -proteina) i da se ne može se povezati sa osobenošću propranolola da vrši „stabilizaciju ćelijske membrane“ (Smith, 1982). Osim toga, smanjenje gustine β -adrenergičkih receptora usled delovanja propranolola je uočeno i na plazma membrani mišjih mišićnih ćelija (BC3H-1) (Hughes i sar., 1988) i srčanih mišićnih ćelija pacova (Baker i Katovich, 1982). Konačno, različit efekat propranolola na ispoljavanje β -adrenergičkog receptora na različitim tipovima ćelija timusa, ide u prilog pretpostavci da efekat propranolola na ispoljavanje β -adrenergičkog receptora zavisi od životinjske vrste, i tipa ćelije na koji ovaj agens deluje (Hughes i sar., 1988).

Sa druge strane, tretman propranololom, u nedostatku hormona testisa, nije uticao na ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u ovom organu. Smatra se da su receptori za kateholamine, i to pre svega β -adrenergički receptor, posebno osetljivi na prisustvo hormona sa „permisivnim“ delovanjem, odnosno na njihov nedostatak (Meier, 1997; Morris i Malbon, 1999). Dakle, lako je zamisliti da u odsustvu muških polnih hormona, usled poremećaja u ekspresiji samog receptora, kao i ekspresiji drugih elemenata odgovarajućeg signalnog puta, poput G-proteina, (Morris i Malbon, 1999) modulatorno delovanje kateholamina u timusu posredstvom β -adrenergičkih receptora postaje manje efikasno/neefikasno. Da bi se proverila ova hipoteza, u narednom eksperimentalnom koraku su ispitivani efekti blokade β -adrenergičkih receptora propranololom na timopoezu, kao osnovnu funkciju timusa kod orhidektomisanih i neorhidektomisanih životinja.

5.7. Uticaj orhidektomije na timopoezu kod odraslih pacova

5.7.1. Uticaj orhidektomije na apoptozu i proliferaciju timocita

U sklopu ispitivanja uticaja muških polnih hormona na modulatorno delovanje kateholamina na timopoezu, u prvom koraku, analiziran je uticaj orhidektomije na sazrevanje T-ćelija u timusu. Merenjem mase timusa i ukupnog broja ćelija u timusu pokazalo se da uklanjanje hormona testisa u uzrastu od 30 dana povećava vrednost ispitivanih parametara. Slično, relativna masa timusa i relativna brojnost timocita

(izražene u odnosu na 100 g telesne mase) su bile povećane kod orhidektomisanih životinja, pokazujući da je efekat intervencije specifičan i nezvan za eventualne promene telesne mase. Ovi nalazi su bili u potpunosti saglasni sa prethodno dobijenim eksperimentalnim podacima. Naime, kod miševa, povećanje veličine timusa je zabeleženo u uslovima nedostatka androgena ili funkcionalnog receptora za androgene (Olsen i sar., 1991a, b), dok je kod odraslih pacova povećanje mase organa kao i ukupnog broja ćelija uočeno nakon orhidektomije i u peripubertetnom uzrastu (Leposavić i sar., 1996; 2002) i u odraslom dobu (Leposavić i sar., 1996; Oner i Ozan, 2002). Sa druge strane, pokazano je da davanje androgena, kako intaktnim, tako i orhidektomisanim životinjama, dovodi do involucije timusa (Greenstein i sar., 1986; Fitzpatrik i Greenstein, 1987; Windmill i sar., 1993). Generalno, nedostatak hormona testisa bi mogao da izazove promene u broju timocita, pre svega, delovanjem na apoptozu i/ili proliferaciju ovih ćelija.

Pokazano je da orhidektomija u uzrastu od 30 dana dovodi do smanjenja relativne zastupljenosti ćelija u apoptozu u suspenziji timocita. U prilog ovom nalazu ide podatak da dihidrotestosteron povećava apoptozu timocita u organ kulturi timusa (Olsen i sar., 1998). Prethodni nalaz podržava i čenjenica da primena flutamida, nesteroidnog antagonista receptora za androgene, *in vivo*, dovodi do povećane ekspresije iRNK za Cbl protein (El Chami i sar., 2005), koji „štiti“ ćelije od apoptoze u timusu miša.

Povećanje procenta proliferišućih ćelija, u suspenziji sveže izolovanih timocita orhidektomisanih pacova, ukazuje da bi povećana proliferacija timocita, takođe, mogla da doprinese povećanoj celularnosti timusa, u odsustvu hormona testisa. Ovaj nalaz podržava povećanje broja mitotski aktivnih timocita kod odraslih orhidektomisanih glodara (Oner i Ozan, 2002), kao i smanjenje broja timocita koji proliferišu u timusu orhidektomisanih pacova kojima je davan testosteron (Oner i Ozan, 2002). Nalaz povećanog broja proliferišućih ćelija u suspenziji timocita orhidektomisanih životinja je u skladu i sa podatkom da dodavanje testosterona u kulturu timocita smanjuje proliferativni odgovor ovih ćelija na konkanavalin A (Yao i Shang, 2005).

Svi navedeni podaci sugerišu da se, bar delom, u osnovi povećane ukupne brojnosti timocita kod orhidektomisanih životinja nalazi smanjena apoptoza, a povećana proliferacija timocita. Promeni mase timusa kod orhidektomisanih životinja bi, pored povećanog broja timocita, mogla da doprinese i povećana proliferacija TEC. Ovu

pretpostavku podržavaju podaci koji pokazuju da visoke (adultne) koncentracije polnih steroidnih hormona, uključujući i androgene, imaju inhibitoran efekat na proliferaciju TEC (Sakabe i sar., 1994). Povećana proliferacija cTEC i mTEC u timusu miša u odsustvu androgena (Williams i sar., 2008) direktno podržava prethodnu pretpostavku.

5.7.2. Uticaj orhidektomije na ispoljavanje antigena diferencijacije timocita

Uklanjanje hormona testisa u uzrastu od 30 dana dovelo je do značajnih promena, kvalitativnih i kvantitativnih, u sazrevanju timocita odraslih pacova. Orhidektomija je ispoljila svoj uticaj već na najnezrelijim stadijumima sazrevanja timocita, smanjujući procenat najnezrelijih DN TCR $\alpha\beta$ - timocita, uz istovremeno povećanje procenta ćelija na sledećem DP TCR $\alpha\beta$ + razvojnom stadijumu ovih ćelija. Smanjenje relativne brojnosti DN TCR $\alpha\beta$ - timocita je bilo očekivano, imajući u vidu pokazano smanjenje procenta ukupnih DN ćelija kod miševa koji, usled defekta u genu koji kodira receptor za androgene, ne mogu odgovoriti na delovanje androgena (Olsen i Kovacs, 1989). U prilog smanjenoj zastupljenosti DN TCR $\alpha\beta$ - timocita kod orhidektomisanih životinja ide i nalaz da tretman dihidrotestosteronom kod kastriranih mužjaka miševa dovodi do povećanja relativne zastupljenosti DN ćelija u timusu (Olsen i sar., 2001). Povećanje ukupnog broja ovih ćelija u timusu orhidektomisanih pacova moglo se, teorijski, ostvariti povećanjem proliferacije, smanjenjem apoptoze, kao i intenziviranim ulaskom prekursora poreklom iz kostne srži. Istraživanja prikazana u ovoj tezi su pokazala smanjenje procenta apoptotskih ćelija, uz povećanje procenta ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa u okviru DN subpopulacije timocita kod orhidektomisanih pacova. Povećanje proliferacije DN ćelija, u saglasnosti je sa podacima koji pokazuju da: 1) proliferacija ovih ćelija zavisi od koncentracije IL-7 (Hare i sar., 1998; Andrew i Aspinall, 2001) i 2) kastracija povećava sintezu IL-7 u TEC i ekspresiju receptora za IL-7 na najnezrelijim timocitima (Heng i sar., 2005).

Pored toga, postoje podaci da androgeni utiču na broj ranih prekursora T-ćelijske loze (Heng i sar., 2005). U okviru Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺⁺ ćelijske populacije kostne srži, identifikovana je subpopulacija Flt-3⁺CCR9⁺ prekursora T-ćelija, koji naseljavaju timus i, potom se diferenciraju u ETP ćelije (Swarz i Bhandoola, 2004; Bhandoola i Sambandam, 2006; Schwarz i sar., 2007). Nakon uklanjanja androgena, broj ETP ćelija u timusu se značajno povećava (Heng i sar., 2005). Osim toga, Williams i saradnici

(2008) su pokazali da intenziviran ulazak ranih progenitora T-ćelijske loze u timus orhidektomisanih miševa predstavlja izuzetno važan korak u povećanju timopoeze nakon uklanjanja androgena. Ovaj fenomen omogućava ekspanzija TEC nakon orhidektomije, kojom se povećava „niša“ za naseljavanje prekursorima timocita. Osim toga, isti autori su pokazali da se nakon orhidektomije u TEC povećava i ekspresija CCL25 (Williams i sar., 2008), koji je ligand za CCR9 receptor ispoljen na ranim T-ćelijskim progenitorima i ima ključnu ulogu u naseljavanju timusa u postnatalnom razvoju (Schwarz i sar., 2007). Dakle, imajući u vidu sve što je prethodno navedeno, može se pretpostaviti da je smanjenje apoptoze i povećanje proliferacije DN ćelija, uz povećan ulazak prekursora iz kostne srži, dovelo do povećanja broja DN TCR $\alpha\beta$ - ćelija. Analizom fenotipskog profila DN TCR $\alpha\beta$ - timocita je pokazana povećana zastupljenost najnezrelijih CD2-CD45RC⁺ i CD2⁺CD45RC⁺ ćelija sa regenerativnim potencijalom (Law i sar., 1989) u okviru ove subpopulacije. Imajući u vidu činjenicu da CCL25 igra i važnu regulatornu ulogu u procesu timopoeze, ubrzavajući sazrevanje najnezrelijih DN timocita (Williams i sar., 2008), prethodni nalaz bi mogao da implicira ubranu diferencijaciju timocitnih prekursora u odsustvu androgena, usled povećanja ekspresije CCL25 molekula (Williams i sar., 2008). Međutim, smanjenje relativne brojnosti CD2⁺CD45RC⁻ ćelija je ukazalo na usporen prelazak ćelija sa CD2⁺CD45RC⁺ na CD2⁺CD45RC⁻ stadijum sazrevanja. Sa druge strane, imajući u vidu povećanje procenta DP TCR $\alpha\beta$ - timocita, koji odgovaraju ćelijama koje su uspešno prošle proces β -selekcije (Zamoyska i Lovat, 2004), nalaz smanjene procentualne zastupljenosti CD2⁺CD45RC⁻ ćelija bi mogao da reflektuje i efikasniju β -selekciju i ubran prelazak DN TCR $\alpha\beta$ - ćelija na naredni DP TCR $\alpha\beta$ - stadijum razvoja. Potrebno je napomenuti da bi povećanje procenta DP TCR $\alpha\beta$ - timocita moglo da bude i posledica povećane proliferacije ovih ćelija, pošto nakon uspešne β -selekcije ćelije prolaze kroz proces deobe (Penit i sar., 1995; Germain, 2002; Bommhardt i sar., 2004; Miosge i Zamoyska, 2007). U prilog ovoj mogućnosti ide i smanjenje procenta DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ timocita, koji nastaju diferencijacijom DP TCR $\alpha\beta$ - ćelija, kada se zna da je zaustavljanje ćelijske deobe preduslov za ekspresiju α -lanca TCR, i prelazak na naredni DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ stadijum razvoja (Xi i sar., 2006). Činjenica da u DP subpopulaciji timocita nije zapaženo povećanje procenta proliferišućih ćelija sugerše da je, najverovatnije, efikasnija β -selekcija dovela do povećanja procenta DP TCR $\alpha\beta$ - ćelija. Kada se smanjenje procenta

DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ ćelija koje ulaze u selekciju (Miosge i Zamoyska, 2007), uz neizmenjen procenat DP TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ ćelija koje su prošle pozitivnu selekciju (Miosge i Zamoyska, 2007), sagleda u kontekstu povećanja relativne zastupljenosti najzrelijih CD4+CD8⁻ JP TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ timocita, može se pretpostaviti da orhidektomija dovodi do povećanja pozitivne i/ili smanjenja negativne selekcije timocita, praćene njihovim efikasnijim sazrevanjem u pravcu ćelija CD4+CD8⁻ fenotipa. Uticaj orhidektomije na pozitivnu selekciju timocita je ispitan merenjem ispoljavanja CD69 antigena. Ovaj „marker aktivacije“ se pojavljuje u prelaznim subpopulacijama ćelija, koje prolaze kroz pozitivnu selekciju (TCR $\alpha\beta$ ⁺), ili su nedavno uspešno prošle ovaj korak (TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺) (Yamashita i sar., 1993). Nalaz smanjenog procenta CD69⁺ ćelija u okviru subpopulacija TCR $\alpha\beta$ ⁺ i TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ timocita je jasno sugerisao da je pozitivna selekcija timocita u odsustvu hormona testisa zapravo smanjena. U cilju ispitivanja uticaja orhidektomije na negativnu selekciju timocita, merena je površinska gustina CD90 (Thy-1) antigena na membrani timocita. Naime, pokazano je da ovaj molekul igra ulogu negativnog regulatora signala koji se prenose posredstvom TCR $\alpha\beta$, pa posledično i „praga“ za negativnu selekciju, tako da je kod Thy-1^{-/-} miševa značajno redukovan nastanak CD4+CD8⁻ i CD4-CD8⁺ JP timocita od DP prekursora (Hueber i sar., 1997). Shodno ovim podacima, povećana gustina CD90 molekula na membrani TCR $\alpha\beta$ ⁺ i TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ timocita je implicirala smanjenje negativne selekcije timocita kod orhidektomisanih pacova. U prilog ovoj mogućnosti išao je nalaz o smanjenoj koncentraciji noradrenalina, kao i o smanjenom ispoljavanju β_2 -adrenergičkog receptora u timusu orhidektomisanih pacova, kao što je diskutovano u prethodnom tekstu. Naime, nađeno je da dodavanje cAMP-a ili noradrenalina u kulturu mišjih timocita, kao i u kulturu ćelija S49 mišje T-ćelijske linje, dovodi do smanjenja sadržaja iRNK za CD90 molekul na dozno-zavisan način (Wajeman-Chao i sar., 1998). Pokazalo se da je efekat noradrenalina posredovan β -adrenergičkim receptorima, i da se ogleđa u posttranskripcionom smanjenju stabilnosti iRNK za CD90 (Wajeman-Chao i sar., 1998). Dakle, uočeno povećanje gustine CD90 antigena na membrani timocita, i, sledstveno, smanjenje negativne selekcije, bi, bar delom, mogli biti posledica manje efikasnosti delovanja noradrenalina posredstvom β_2 -adrenergičkih receptora, u odsustvu hormona testisa. Podatak o povećanju relativne zastupljenosti CD4+CD8⁻ JP TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ timocita je u skladu prethodno pokazanim povećanjem procenta ukupne subpopulacije

CD4+CD8- ćelija u timusu Albino Oxford pacova orhidektomisanih u prepubertetnom uzrastu (Leposavić i sar., 1996). Međutim, ovaj nalaz se razlikuje od nalaza koji je dobijen kod miševa, kod kojih orhidektomija dovodi do smanjenja relativne brojnosti CD4-CD8+ timocita, ne utičući na CD4+CD8- ćelije (Viselli i sar., 1995b). Postoji nekoliko objašnjenja za uočeno neslaganje. Prvo, razlog može biti postojanje razlika između vrsta, preciznije između miša i pacova, u procesu timopoeze (Hünig i sar., 2001). Između ostalog, DP timociti miša i pacova pokazuju različit odgovor na jake signale koji se prenose putem TCR $\alpha\beta$, u smislu linijskog opredeljenja. U identičnim uslovima, na snažnu stimulaciju TCR $\alpha\beta$, mišje DP ćelije reaguju usmeravanjem ka CD4+CD8- fenotipu, dok je razvoj njihovih ekvivalenata kod pacova „programiran“ ka CD4-CD8+ T-limfocitima (Mitnacht i sar., 1998). Na osnovu ovih podataka bi se moglo spekulirati da u uslovima jako izraženog ispoljavanja CD90 antigena, kao u slučaju orhidektomije, TCR $\alpha\beta$ -zavisni signali bivaju oslabljeni toliko da se razvoj DP ćelija usmerava ka linji CD4+CD8- T-ćelija. Drugo, utvrđeno je i postojanje sojnih razlika u procesu diferencijacije timocita kod miša (Matsumoto i sar., 1991), pri čemu se, zavisno od soja, efekat kastracije može ispoljiti na nivou različitih subpopulacija, uključujući i CD4+CD8- ćelije (Aboudkhalil i sar., 1991). Treće, poznato je da efekti orhidektomije na timopoezu mogu biti različiti, zavisno od toga da li se intervencija izvodi u odraslom ili dobi pre postizanja polne zrelosti (Leposavić i sar., 1996). Iako je, kod orhidektomisanih životinja, favorizovan razvoj CD4+CD8- JP TCR $\alpha\beta$ ++ ćelija, ukupan broj ćelija u okviru obe subpopulacije JP timocita je bio povećan u hiperplastičnim timusima orhidektomisanih životinja. Ovaj nalaz, je, makar delimično, bio posledica povećane proliferacije ćelija u ovim subpopulacijama timocita. Ovo povećanje se može povezati sa podacima koji ukazuju da je ova proliferacija zavisna od koncentracije IL-7 (Hare i sar., 1998; Andrew i Aspinall, 2001), čija se sinteza, kao što je već rečeno, povećava u odsustvu polnih steroida (Heng i sar., 2005).

Jedna od osnovnih funkcija timusa je eliminacija potencijalno autoreaktivnih T-ćelija mehanizmima negativne selekcije ili funkcijske deaktivacije (Kappler i sar., 1987; Ramsdell i sar., 1989; Klein i Jovanovic, 2011). Kako je orhidektomija dovela do smanjenja negativne selekcije timocita, moglo se očekivati da će najzrelije subpopulacije timocita biti „obogaćene“ potencijalno autoreaktivnim ćelijama. Sa druge strane, budući da se autorektivne ćelije u populaciji perifernih T-limfocita nalaze pod

kontrolom dominantnog oblika tolerancije, odnosno regulatornih ćelija (Modigliani i sar., 1995), nametnulo se pitanje da li je orhidektomija uticala na stvaranje ovih ćelija u timusu.

Nedostatak hormona testisa je uticao i na diferencijaciju regulatornih T-ćelija u timusu. Upadljiv porast ukupnog broja timocita se odrazio i na povećanje broja CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u timusu orhidektomisanih pacova, dok je, nasuprot tome, njihov procenat bio smanjen. Kao što je prethodno sugerisano, usled povećanja ispoljavanja CD90 molekula na membrani timocita i njegovog inhibitorynog delovanja na prenos signala putem TCR $\alpha\beta$, u timusu orhidektomisanih pacova dolazi do promena „praga“ za selekciju timocita. Diferencijacija CD4+CD25+Foxp3+ ćelija podrazumeva prisustvo agonističkog signala (Starr i sar., 2003), pri čemu „prag“ za selekciju ovih timocita zahteva signal čija se jačina nalazi u opsegu vrednosti između onih koje su potrebne za pozitivnu i onih koje su potrebne za negativnu selekciju (Klein i Jovanovic, 2011). Kako je opseg afiniteta TCR $\alpha\beta$ – MHC-peptid interakcija koji razdvaja pozitivnu i negativnu selekciju izuzetno uzak (Daniels i sar., 2006), izraženo povećanje gustine CD90 molekula na membrani timocita orhidektomisanih pacova bi moglo smanjiti intenzitet signala koji se prenosi putem TCR $\alpha\beta$ i ispod nivoa neophodnog za selekciju CD4+CD25+Foxp3+ timocita. Uz stimulaciju agonističkim peptidom, jedan od ključnih faktora u nastajanju CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u timusu predstavlja IL-2, mada njegovo delovanje, u izvesnom stepenu, mogu zameniti i IL-7 i IL-15 (Bayer i sar., 2008; Vang i sar., 2008). Timociti miševa sa defektnim genom za receptor za androgene u kulturi proizvode više IL-2, u odnosu na kontrolne miševe osetljive na delovanje androgena (Olsen i Kovacs, 1989). Povećana produkcija IL-2 u timusu bi se mogla očekivati i usled smanjene koncentracije noradrenalina i, moguće, manje gustine β_2 -adrenergičkog receptora na ćelijama timusa orhidektomisanih životinja. Naime, pokazano je da kateholamini, delujući posredstvom β -adrenergičkih receptora, negativno utiču na sintezu IL-2 (Elenkov i sar., 2000). Pored toga, kao što je prethodno sugerisano (Heng i sar., 2005), kastracija stimuliše sintezu IL-7. Dakle, povećana koncentracija IL-2 i IL-7 bi mogla doprineti povećanju ukupne brojnosti CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u timusu orhidektomisanih pacova.

Konačno, orhidektomija je dovela do povećanja ukupnog broja i procenta CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u timusu. Povećanje procenta ovih ćelija se može

povezati sa promenama u selekciji timocita. Naime, prisustvo prejakih agonističkih signala dovodi do zaustavljanja diferencijacije NKT ćelija, moguće usled indukcije negativne selekcije (Chun i sar., 2003; Pellicci i sar., 2003). Dakle, visoka gustina CD90 molekula bi, smanjujući intenzitet signala koji prenosi TCR $\alpha\beta$, mogla uzrokovati smanjenje negativne selekcije kako konvencionalnih, tako i CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u timusu orhidektomisanih pacova. Pored toga, ključnu ulogu u sazrevanju NKT ćelija ima i IL-15, što ilustruje činjenica da miševi sa deficijencijom IL-15 nemaju normalan broj ovih ćelija, niti u timusu niti na periferiji (Kennedy i sar., 2000; Matsuda i sar., 2002). Takođe, ovaj citokin se smatra neophodnim faktorom preživljavanja NKT ćelija u timusu (Castillo i sar., 2010). Pokazano je da orhidektomija dovodi do povećane ekspresije IL-15 u ventralnoj prostati pacova (Desai i sar., 2004). Pod pretpostavkom da sličan mehanizam postoji i u timusu, povećana produkcija ovog citokina usled orhidektomije bi mogla doprineti povećanom stvaranju ćelija CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + fenotipa u timusu.

Generalno, na osnovu svih prethodno iznetih podataka, može se zaključiti da orhidektomija kod pacova, delujući neposredno na timocite i posredno, modulacijom ekspresije citokina u ćelijama strome timusa, povećava efikasnost timopoeze. Hirurško uklanjanje testisa, uz kvantitativne, dovodi i do kvalitativnih promena u timopoezi favorizujući razvoj ćelija CD4+CD8- fenotipa, smanjujući učešće CD25+Foxp3+ ćelija u procentualno uvećanoj subpopulaciji najzrelijih CD4+CD8- TCR $\alpha\beta$ ++ JP timocita i povećavajući udeo CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u procentualno neizmenjenoj subpopulaciji najzrelijih CD4-CD8+ TCR $\alpha\beta$ ++ JP timocita.

5.8. Uticaj orhidektomije na broj i fenotipske karakteristike T-ćelija u perifernoj krvi odraslih pacova

Promene u sazrevanju T-limfocita rezultovale su i promenom u zastupljenosti T-ćelija na periferiji. Naime, iako se procentualna zastupljenost T-limfocita u perifernoj krvi orhidektomisanih pacova nije menjala, ukupan broj ovih ćelija u krvi orhidektomisanih životinja je bio značajno povećan. Ovo povećanje je odražavalo veći broj i CD4+ i CD8+ T-limfocita. Ovaj nalaz je bio u skladu sa podacima dobijenim kod adultnih orhidektomisanih mužjaka miševa, kod kojih nedostatak androgena u trajanju od dve do bar osam nedelja uzrokuje hiperplaziju timusa, praćenu povećanjem broja

CD4+ i CD8+ T-limfocita na periferiji (Roden i sar., 2004). Pored toga, pokazano je da davanje testosterona ne utiče na procenat T-ćelija u perifernoj krvi pacova (Yao i sar., 2003). Međutim, na istom eksperimentalnom modelu je pokazano da tretman testosteronom povećava procentualnu zastupljenost CD8+ limfocita, menjajući odnos procentualne zastupljenosti CD4+ i CD8+ T-limfocita (Yao i sar., 2003). Sa druge strane, kod orhidektomisanih pacova, zabeležen je porast procenta CD4+ ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + populacije u perifernoj krvi. Neslaganje je moguće objasniti činjenicom da je tretman testosteronom trajao dve nedelje, dok je u istraživanjima prikazanim u ovom radu procentualna zastupljenost glavnih subpopulacija T-limfocita merena 30. dana nakon orhidektomije. U prilog ovoj pretpostavci idu podaci koji pokazuju povećanje relativne zastupljenosti CD4+ ćelija, nakon tridesetodnevnog tretmana androgenom (Zofková i sar., 1995).

U cilju sagledavanja značaja prethodno diskutovanih rezultata potrebno je istaći da se, generalno, timus smatra glavnim mestom delovanja muških polnih hormona na adaptivni odeljak imunskog sistema (Alexander i Stimson, 1988; Olsen i Kovacs, 1996). Ovakav stav je zasnovan na podacima da, za razliku od timocita, zrele T-ćelije na periferiji ne eksprimiraju klasičan receptor za androgene (Alexander i Stimson, 1988; Olsen i Kovacs, 1996). Preciznije, T-limfociti slezine miša, zapravo, eksprimiraju unutarćelijski receptor za androgene, što je potvrđeno prisustvom iRNK kao i odgovarajućeg proteinskog produkta u ovim ćelijama (Benten i sar., 1999), ali je ovaj receptor funkcionalno neaktivan, što je pokazano odsustvom njegove translokacije u jedro u prisustvu androgena. Istraživanja prikazana u ovom radu su pokazala da je kod orhidektomisanih pacova procenat svežih timusnih emigranata u okviru CD4+ subpopulacije T-ćelija periferne krvi bio povećan, dok se udeo ovih ćelija u okviru CD8+ subpopulacije nije menjao. Imajući u vidu ove podatke i činjenicu da je odnos procentualne zastupljenosti CD4+ i CD8+ ćelija u okviru TCR $\alpha\beta$ + populacije periferne krvi kod orhidektomisanih pacova pokazivao veću zastupljenost CD4+ ćelija, jasno je da ova istraživanja dalje potvrđuju ključnu ulogu timusa u definisanju odnosa zastupljenosti ove dve glavne subpopulacije T-ćelija kod glodara (van Meerwijk i sar., 1998; Damoiseaux i sar., 1999). Ovo je u skladu sa podacima koji pokazuju da kastracija kod miša dovodi do povećanja procenta naivnih T-ćelija, kojima pripadaju i sveži timusni emigranti, na periferiji (Roden i sar., 2004; Goldberg i sar., 2005;

Sutherland i sar., 2008; Barnard i sar., 2009; Williams i sar., 2008), i da se ovaj efekat gubi ukoliko se životinje pre kastracije podvrgnu timektomiji (Roden i sar., 2004; Barnard i sar., 2009). U zaključku, nedostatak hormona testisa, usled porasta efikasnosti timopoeze, povećavajući zastupljenost CD4⁺ T-ćelija u perifernoj krvi, brojno povećava T-ćelijski odeljak periferne krvi u celini, ali istovremeno menja odnos zastupljenosti CD4⁺ i CD8⁺ T-ćelija, tzv. imunoregulatorni CD4⁺/CD8⁺ odnos T-ćelija na periferiji, koji predstavlja merilo funkcionalnog stanja imunskog sistema (Yao i sar., 2003).

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su pokazala da orhidektomija dovodi i do povećanja broja regulatornih CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ćelija u perifernoj krvi orhidektomisanih pacova. Osim toga, uprkos smanjenju procentualne zastupljenosti CD25⁺Foxp3⁺ ćelija u okviru subpopulacije CD4⁺ timocita, procenat CD25⁺Foxp3⁺ ćelija u okviru CD4⁺ subpopulacije T-ćelija periferne krvi je bio povećan. Ovo se može objasniti činjenicom da ćelije CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ fenotipa, osim u timusu, nastaju i na periferiji - adaptivne regulatorne T-ćelije. U prilog ovoj mogućnosti idu podaci koji pokazuju povećanje procenta i broja CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ćelija u slezini kastriranih miševa (Barnard i sar., 2009). Takođe, pokazano je da kastracija miševa Pten^{-/-} fenotipa obolelih od kancera prostate dovodi do ekspanzije CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatornih T-ćelija na periferiji, najverovatnije usled povećane sinteze IL-2 (Tang i sar., 2012).

U CD8⁺ odeljku T-ćelija periferne krvi, orhidektomija je dovela do povećanja apsolutnog broja NKT ćelija. Imajući u vidu povećanje broja i procenta CD8⁺CD161⁺TCRαβ⁺ ćelija u timusu, povećanje broja NKT ćelija u perifernoj krvi bi moglo da se poveže sa efikasnijim stvaranjem ćelija ovog fenotipa u timusu orhidektomisanih životinja. Međutim, treba ukazati da su ispitivanja kod kongenitalno atimičnih miševa (engl. nude mice) pokazala da se ćelije istog fenotipa kao one koje nastaju u timusu stvaraju i na periferiji (MacDonald, 1995). U skladu sa ovim nalazom, promena broja NKT ćelija u perifernoj krvi bi mogla biti i odraz promena u njihovoj diferencijaciji van timusa. Međutim, podaci koji ukazuju da u uslovima smanjenog stvaranja ovih ćelija u timusu tokom starenja raste njihovo stvaranje izvan timusa (Pawelec i sar., 1998), ne ide u prilog predhodnoj tezi.

5.9. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na timopoezu kod odraslih pacova u prisustvu hormona testisa

5.9.1. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na apoptozu i proliferaciju timocita

Ispitivanje uticaja dugotrajnog davanja propranolola na proces diferencijacije i sazrevanja T- limfocita započeto je merenjem efekta tretmana na masu timusa i brojnost timocita kod neorhidektomisanih životinja. Uočeno je da su masa organa i ukupan broj timocita ostali nepromenjeni u odgovoru na tretman. Ni u ranijim ispitivanjima uticaja blokade β -adrenergičkih receptora na timopoezu, kod miša (Madden i Felten, 2001) i Wistar pacova (Leposavić i sar., 2000b; 2006), nije pokazana promena mase i broja timocita u timusu.

Kako apoptoza i proliferacija timocita predstavljaju faktore koji, u najvećoj meri, određuju broj ovih ćelija u timusu (Pazirandeh i sar., 2005), moglo se zaključiti da je povećanje ukupne apoptoze timocita proporcionalno povećanju ukupne proliferacije ovih ćelija bar jedan od razloga stabilnosti broja timocita nakon tretmana propranololom. Podaci niza istraživačkih grupa idu u prilog prethodno pomenutim nalazima. Pokazano je povećanje procenta timocita u apoptozi *in situ*, kod pacova podvrgnutih hemijskoj simpatektomiji 6-hidroksidopaminom (Al-Shawaf i sar., 1991). Sličan efekat simpatektomije na apoptozu timocita je uočen i kod miša, u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Tsao i sar., 1996). Preuzimanje 6-hidroksidopamina u nervna vlakna i njihova degeneracija, se može preduprediti primenom desipramina, antagonista preuzimanja kateholamina, što je u *in vivo* uslovima praćeno znatno manje izraženom apoptozom timocita (Tsao i sar., 1996). Dakle, može se zaključiti da je povećanje apoptoze timocita u prisustvu 6-hidroksidopamina, velikim delom, posledica nedostatka noradrenalina iz nervnih vlakana. Pored toga, pokazano je i da tretman propranololom dovodi do povećanja spontane apoptoze timocita pacova u kulturi (Leposavić i sar 2006).

Kada je u pitanju povećana proliferacija timocita u odgovoru na tretman propranololom, podaci o uticaju kateholamina na ovaj proces su zaista brojni. Hemijska simpatektomija ima za posledicu povećanje procenta proliferišućih timocita pacova *in situ* (Al-Shawaf i sar., 1991), što bi, najverovatnije, moglo biti posledica promenjene osetljivosti timocita na proliferativne stimuluse. Naime, u kulturi timocita miša direktno je pokazano da se sposobnost ovih ćelija da proliferišu u odgovoru na konkanavalin A

smanjuje pod uticajem kateholamina (Singh i Owen, 1976; Cook-Mills i sar., 1995). Pored toga, pokazano je da cAMP u kulturi timocita pokazuje inhibitorno delovanje na odvijanje ćelijskog ciklusa (Sandberg i Fredholm, 1981). Komplementarni rezultati su dobijeni i u pacovskom modelu, na kojem je pokazano da timociti životinja koje su tretirane piretroidima, jakim stimulatorima otpuštanja adrenalina i noradrenalina (Desi i sar., 1985; Madsen i sar., 1996; Santoni i sar., 1998), imaju smanjenu sposobnost proliferacije u odgovoru na konkanavalin A (Ray i Cramer, 1979). Shodno prethodnim nalazima, tretman propranololom kod pacova soja Wistar dovodi do povećanja procenta proliferišućih ćelija (Leposavić i sar., 2006). Na osnovu svega prethodno navedenog, moguće je spekulirati da u timusu pacova koji su primali propranolol, proporcionalnim povećanjem proliferacije i apoptoze timocita, dolazi do uspostavljanja nove ravnoteže između ova dva homeostatska procesa, tako da ukupan broj timocita u organu ostaje nepromenjen.

5.9.2. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na ispoljavanje antigena diferencijacije timocita

Slično kao od pacova soja Wistar, kod pacova Albino Oxford soja je pokazano da dugotrajan tretman propranololom utiče na diferencijaciju/sazrevanje timocita. Za razliku od pacova soja Wistar (Leposavić i sar., 2006), kod pacova soja Albino Oxford ovaj tretman deluje, ne samo na selekzione procese, već i na zastupljenost najnezrelijih subpopulacija timocita koje još nisu ušle u proces selekcije. Ovo je u skladu sa podacima koji ukazuju na sojne razlike u procesu sazrevanja T-ćelija u timusu (Matsumoto i sar., 1991), kao i na sojne razlike u farmakokinetici, i sledstveno, delovanju propranolola kod pacova (Rauški i sar., 2003a, b; Komura i Iwaki, 2005).

Odsustvo promene broja i procenta DN TCR $\alpha\beta$ - timocita, u svetlu podataka koji ukazuju da se procenat ni proliferišućih ni apoptotskih ćelija u ovoj subpopulaciji nije menjao, u suspenziji timocita izolovanih iz propranololom tretiranih životinja u odnosu na kontrolne suspenzije ovih ćelija, je sugerisao da tretman propranololom ne utiče ni na ulazak prekursorskih ćelija iz kostne srži u timus.

Prema dostupnim saznanjima, promene u fenotipskom profilu subpopulacije DN TCR $\alpha\beta$ - timocita, u odgovoru na delovanje propranolola, nisu do sada ispitivane kod eksperimentalnih životinja. Istraživanja vezana za ovu disertaciju su pokazala da je, u

okviru DN TCR $\alpha\beta$ - subpopulacije, došlo do smanjenja relativne i apsolutne brojnosti najnezrelijih CD2-CD45RC+ i CD2+CD45RC+ ćelija (Law i sar., 1989), uz proporcionalno povećanje relativne i apsolutne zastupljenosti CD2+CD45RC- ćelija. Ovakav nalaz bi mogao da odražava ubranu diferencijaciju/sazrevanje timocita do CD2+CD45RC- stadijuma razvoja. Do akumulacije ćelija na CD2+CD45RC- stadijumu razvoja, najverovatnije, dovodi relativno/apsolutno smanjenje efikasnosti dalje diferencijacije/sazrevanja ovih ćelija. Smanjenje procentualne zastupljenosti i ukupnog broja DP TCR $\alpha\beta$ - ćelija, koje su uspešno prošle β -selekciju (Zamoyska i Lovatt, 2004; Miosge i Zamoyska, 2007), u kontekstu smanjenja procenta i ukupnog broja DP TCR $\alpha\beta$ + timocita, koji ulaze u pozitivnu selekciju (Shortman i sar., 1991; Jameson i sar., 1995; Zamoyska i Lovatt, 2004; Miosge i Zamoyska, 2007), a povećanja relativnog i apsolutnog broja DP TCR $\alpha\beta$ ++ timocita, koji su uspešno prošli pozitivnu selekciju (Shortman i sar., 1991), bi moglo da implicira povećanje efikasnosti β -selekcije i ubran prelazak ćelija sa DP TCR $\alpha\beta$ - na sledeći DP TCR $\alpha\beta$ + stadijum razvoja. U prilog ovakvom sagledavanju rezultata, na prvi pogled, ne bi išlo smanjenje procentualne zastupljenosti i ukupnog broja DP TCR $\alpha\beta$ + timocita. Sa druge strane, smanjenje procentualne zastupljenosti i ukupnog broja DP TCR $\alpha\beta$ + timocita, u svetlu povećanja relativne i apsolutne brojnosti DP TCR $\alpha\beta$ ++ timocita, kao i najzrelijih TCR $\alpha\beta$ ++ JP ćelija oba fenotipa, ide u prilog većoj efikasnosti β -selekcije, uz povećanje efikasnosti pozitivne selekcije i/ili smanjenje efikasnosti negativne selekcije timocita. Budući da ćelije koje su uspešno prošle β -selekciju intenzivno proliferišu (Penit i sar., 1995; Germain, 2002; Bommhardt i sar., 2004; Miosge i Zamoyska, 2007), u prilog povećanju efikasnosti odvijanja β -selekcije ide i nalaz povećanog procenta proliferišućih ćelija u okviru subpopulacije DP timocita neorhidektomisanih životinja tretiranih propranololom

U cilju ispitivanja promena u pozitivnoj selekciji, analizirano je ispoljavanje CD69 markera u subpopulacijama TCR $\alpha\beta$ + i TCR $\alpha\beta$ ++ timocita. Suprotno očekivanom, pokazalo se da kod nekastriranih pacova tretiranih propranololom dolazi do smanjenja procenta CD69+ timocita u okviru obe ispitivane subpopulacije, što ukazuje na manju efikasnost pozitivne selekcije. Ovaj nalaz je dodatno potvrdilo povećanje procenta DP ćelija u apoptozi, koje je, najverovatnije, bilo posledica povećanog umiranja usled „zanemarivanja“ ćelija koje nisu uspešno prošle pozitivnu

selekciju (Jameson i sar., 1995; Zamoyska i Lovatt, 2004). Sa druge strane, povećanje gustine CD90 molekula na membrani kako preselekcioni DP TCR $\alpha\beta$ +, tako i postselekcioni DP TCR $\alpha\beta$ ++ timocita, ide u prilog smanjenoj negativnoj selekciji timocita pacova koji su primali propranolol. U svetlu prethodno iznetih podataka, moguće je zaključiti da, kod neorhidektomisanih životinja tretiranih propranololom, zaista dolazi do povećanja efikasnosti timopoeze, najverovatnije, usled povećanja efikasnosti β -selekcije i smanjenja efikasnosti negativne selekcije timocita, a uprkos smanjenoj pozitivnoj selekciji ovih ćelija.

Više izražen porast procenta i broja CD4-CD8+ TCR $\alpha\beta$ ++ JP timocita u odnosu na ćelije CD4+CD8- TCR $\alpha\beta$ ++ fenotipa kod životinja tretiranih propranololom, bi mogao biti, bar delom, posledica povećane postselekcione/preemigracione proliferacije (Hare i sar., 1998; Penit i Vasseur, 1997) ovih ćelija. U prilog ovoj tvrdnji govori veći procenat ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa u okviru CD4-CD8+ JP subpopulacije u suspenziji timocita izovanih iz ovih životinja.

Kako je tretman propranololom, kao i orhidektomija, uzrokovao smanjenje negativne selekcije timocita, postavilo se pitanje da li se ovo smanjenje odrazilo i na sazrevanje CD4+CD25+Foxp3+ i CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + regulatornih ćelija u timusu. Uočeno je da u timusu pacova tretiranih propranololom dolazi do povećanja procenta i apsolutnog broja ćelija CD4+CD25+Foxp3+ regulatornog fenotipa. Ovaj nalaz je bio u skladu sa podacima koji su ukazivali da dugotrajno davanje propranolola dovodi do povećanja procenta i apsolutnog broja CD4+CD25+ timocita kod pacova soja Wistar (Leposavić i sar., 2006), odnosno CD4+CD25+RT6- ćelija kod pacova Albino Oxford soja (Leposavić i sar., 2007). Kao što je prethodno diskutovano, diferencijacija ćelija regulatornog fenotipa u timusu zahteva prisustvo TCR $\alpha\beta$ -zavisnog signala koji se intenzitetom nalazi između signala koji dovode do pozitivne, odnosno negativne selekcije konvencionalnih T-ćelija (Klein i Jovanovic, 2011). S obzirom na uočeno povećanje gustine ekspresije CD90 molekula na timocitima pacova tretiranih propranololom, te ulogu ovog molekula u negativnoj regulaciji signala koji se prenosi putem TCR $\alpha\beta$, moguće je očekivati da signali koji bi po sebi doveli do negativne selekcije timocita, u ovakvoj situaciji dostižu intenzitet neophodan za selekciju regulatornih ćelija. Ovakvu mogućnost podržavaju i podaci o smanjenoj negativnoj selekciji, kao i povećanom nastanku ćelija regulatornih karakteristika, kod miševa

kojima je „prigušeno“ prikazivanje antigena na površini medularnih epitelnih ćelija, što dovodi do smanjenja aviditeta interakcije između $TCR\alpha\beta$ i kompleksa MHC II molekulo-sopstveni peptid (Aschenbrenner i sar., 2007).

U prisustvu polnih hormona, tretman propranololom je povećao relativnu i apsolutnu zastupljenost i ćelija $CD8+CD161+TCR\alpha\beta+$ regulatornog fenotipa u timusu. Nastanak ovih ćelija zahteva interakciju $TCR\alpha\beta$ sa neklasičnim molekulom klase I (CD1d) visokog aviditeta (Starr i sar., 2003). Shodno tome, može se pretpostaviti da bi veća zastupljenost ćelija $CD8+CD161+TCR\alpha\beta+$ fenotipa u timusu životinja tretiranih propranololom mogla odražavati povećano ispoljavanje CD90 molekula na membrani timocita i smanjenje intenziteta signala negativne selekcije, do nivoa neophodnog za pozitivnu selekciju ovih ćelija.

Na kraju, treba naglasiti da bi propranolol do opisanih promena u sazrevanju timocita mogao da dovede ne samo direktnim delovanjem na T-ćelije u razvoju, već i indirektno, delovanjem na ćelije strome timusa. Naime, imunocitohemijskim bojenjem je pokazano da TEC, posebno u supkapsularnom odeljku i na medularnoj strani kortikomedularne spojnice ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor. Osim toga, postoje podaci koji ukazuju da TEC, pored funkcionalnog β_2 -adrenergičkog receptora, ispoljavaju i funkcionalan β_1 -adrenergički receptor (Kurz i sar., 1997; von Patay i sar., 1998). Kateholamini, posredstvom ovih receptora, stimulišu oslobađanje IL-6 iz TEC gajenih u kulturi (von Patay i sar., 1998; 1999). Kod miša, IL-6 je važan faktor u preživljavanju nezrelih timocita DN3 i DN4 fenotipa (Yarilin i Belyakov, 2004), u diferencijaciji $CD4-CD8+$ citotoksičnih T-ćelija (Takai i sar., 1988), kao i u stimulaciji proliferacije najzrelijih JP timocita (Chen i sar., 1989; Suda i sar., 1990). Imajući u vidu povećanje ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora u TEC pacova tretiranih propranololom, sledstveno povećanje sekrecije IL-6 bi moglo pružiti dodatno objašnjenje za akumulaciju nezrelih $CD2+CD45RC-$ timocita, potencirano sazrevanje timocita ka $CD4-CD8+ TCR\alpha\beta++$ JP fenotipu, kao i povećanje preemigracione proliferacije ovih ćelija.

Konačno, poznato je da propranolol ima sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i nakupljanja u centralnom nervnom sistemu (Neil-Dwyer i sar., 1981), utičući, pri tome, na otpuštanje liberina i statina iz hipotalamusa, te, posledično, na lučenje niza hormona hipofize, poput adrenokortikotropnog hormona, tireotropnog

hormona, hormona rasta i prolaktina (Oberbeck i sar., 1999; Daftary i sar., 2000; Cheolyoung i sar., 2003). Svi navedeni hormoni, delujući direktno na timus, ili posredstvom endokrinih žlezda, čiju funkciju stimulišu, su, kako je pokazano, uključeni u modulaciju timopoeze (Blalock, 1989; Savino i Dardenne, 2000).

U zaključku, propranolol, delujući na timocite i/ili TEC, direktno ili indirektno (posredstvom efekata na nivou centralnog nervnog sistema), dovodi do povećanja efikasnosti timopoeze kod neorhidektomisanih pacova, koje se ogleda u povećanom stvaranju T-ćelija. Povećanje efikasnosti timopoeze kod ovih životinja je praćeno, najverovatnije, intenzivnijim stvaranjem autoreaktivnih efektorskih ćelija, usled manje efikasnosti negativne selekcije, ali i ćelija regulatornog fenotipa.

5.10. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na broj i fenotipske karakteristike T-ćelija u perifernoj krvi odraslih pacova u prisustvu hormona testisa

Kod pacova tretiranih propranololom, procenat i ukupan broj T-limfocita u perifernoj krvi je bio veći nego kod kontrolnih životinja, pri čemu se procentualna zastupljenost CD4+ i CD8+ ćelija u TCR $\alpha\beta$ + populaciji nije menjala. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima dobijenim kod miševa tretiranih nadololom, neselektivnim antagonistom β -adrenergičkih receptora (Madden i Felten, 2001), kao i pacova Dark Agouti soja koji su primali propranolol (Rauški i sar., 2003a), kod kojih, takođe, nije uočena promena u relativnoj zastupljenosti niti CD4+, niti CD8+ ćelija u perifernoj krvi. Povećanje ukupnog broja T-ćelija ostvareno je kroz proporcionalno povećanje brojnosti CD4+TCR $\alpha\beta$ + i CD8+TCR $\alpha\beta$ + limfocita u perifernoj krvi. Povećanje broja CD8+TCR $\alpha\beta$ + limfocita je u skladu sa nalazima da se u uslovima hronične stimulacije β -adrenergičkih receptora smanjuje broj ovih ćelija (Maisel i Michell, 1990; Mills i sar., 1999). Sa druge strane, nalaz povećanog broja CD4+TCR $\alpha\beta$ + limfocita u perifernoj krvi propranololom tretiranih životinja je u skladu sa podacima koji pokazuju da davanje noradrenalina, ili stimulacija β -adrenergičkih receptora dovodi do smanjenja broja CD4+ T-limfocita u perifernoj cirkulaciji (Sanders i Straub, 2002). Izostanak promene odnosa procentualne zastupljenosti CD4+/CD8+ limfocita u okviru T-ćelijske populacije u perifernoj krvi životinja tretiranih propranololom, uprkos izmenjenom odnosu zastupljenosti najzrelijih CD4+CD8- / CD4-CD8+ TCR $\alpha\beta$ ++ JP timocita, bi se mogao objasniti redistribucijom limfocita između periferne krvi i limfoidnih organa. U

prilog ovoj pretpostavci idu podaci da noradrenalin, mehanizmom zavisnim od β -adrenergičkih receptora, stimuliše izlazak leukocita iz slezine, koji izostaje u prisustvu propranolola (Rogausch i sar., 1999). Takođe, utvrđeno je da primena agonista β -adrenergičkih receptora dovodi do oslobađanja limfocita iz humane slezine, tako da smanjuje odnos zastupljenosti CD4+ i CD8+ T-limfocita u perifernoj krvi (Van Tits i sar., 1990), pa da se suprotan efekat može očekivati u prisustvu antagonista ovih receptora.

U perifernoj krvi pacova koji su primali propranolol je nađen povećan procenat, i posledično, povećan ukupan broj svežih timusnih emigranata u okviru CD4+ i CD8+ subpopulacija T-ćelija, što je ukazivalo da se povećanje broja ovih ćelija može povezati sa njihovim povećanim stvaranjem u timusu.

Tretman propranololom je doveo do povećanja procentualnog učešća CD25+Foxp3+ ćelija u CD4+ subpopulaciji T-limfocita periferne krvi, kao i ukupnog broja CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u perifernoj krvi. Imajući u vidu povećanje procenta CD25+Foxp3+ u okviru subpopulacije CD4+ ćelija i broja CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u timusu, može se pretpostaviti da je povećanje njihove brojnosti u perifernoj krvi nastalo kao posledica povećane efikasnosti timopoeze. Imajući u vidu činjenice koje ukazuju da TGF- β igra presudnu ulogu u nastajanju adaptivnih regulatornih ćelija na periferiji (Chen i sar., 2003; Li i sar., 2006; Marie i sar., 2006) i da kateholamini, posredstvom β -adrenergičkih receptora, povećavaju produkciju ovog citokina u slezini miša (Straub i sar., 2011), kao i u fibroblastima srca *in vitro* (Fisher i Absher, 1995), povećano stvaranje ćelija CD4+CD25+Foxp3+ fenotipa van timusa u uslovima dugotrajnog tretmana propranololom ne izgleda verovatno. Šta više, kako supresivna funkcija Treg ćelija na periferiji kritično zavisi od produkcije ćelija ovog fenotipa u timusu (Haas i sar., 2007), može se očekivati da efikasnija timopoeza povećava ne samo zastupljenost već i supresivni kapacitet Treg ćelija u perifernoj krvi neorhidektomisanih pacova.

Konačno, uprkos porastu broja CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + i procenta CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u subpopulaciji CD8+ timocita, u timusu životinja tretiranih propranololom, došlo je do pada procentualne zastupljenosti ćelija ovog fenotipa u okviru CD8+ subpopulacije T-ćelija periferne krvi, dok se njihov broj u perifernoj krvi nije menjao. Ovaj fenomen bi se mogao povezati sa podacima koji ukazuju da: 1) je za preživljavanje NKT ćelija neophodno prisustvo TGF- β (Bendelac i sar., 2007; Godfrey i

sar., 2010) i 2) da propranolol inhibira sintezu TGF- β (Fisher i Absher, 1995; Straub i sar., 2011). Konačno, smanjeno stvaranje ovih ćelija izvan timusa se takođe ne može isključiti. Tu pretpostavku podržava podatak da se kod miševa podvrgnutih parcijalnoj hepatektomiji, tokom regeneracije ovog organa, usled aktivacije simpatikusa povećava procenat i broj NKT ćelija, što je moguće sprečiti davanjem propranolola (Minagawa i sar., 2000).

5.11. Uticaj dugotrajnog tretmana propranololom na timopoezu i broj i fenotipske karakteristike T-ćelija u perifernoj krvi odraslih pacova u odsustvu hormona testisa

U sledećem koraku, da bi se konačno odgovorilo na pitanje da li orhidektomija menja modulatorno delovanje kateholamina na timopoezu, ispitivani su i efekti tretmana propranololom na timopoezu kod orhidektomisanih životinja. U odsustvu hormona testisa, tretman propranololom nije značajno uticao na masu timusa i broj timocita. Pored toga, statistički značajne promene u ukupnoj apoptozi i proliferaciji timocita nisu uočene. Nije bilo promena ni u zastupljenosti apoptotskih, odnosno ćelija u proliferaciji u okviru glavnih subpopulacija timocita. Kada je u pitanju delovanje propranolola na ispoljavanje antigena diferencijacije, pokazano je da je, u poređenju sa životinjama kojima testisi nisu bili uklonjeni, davanje propranolola bilo bez efekta, ili da su efekti tretmana bili znatno manje izraženi. Izuzetak je bila subpopulacija DP TCR $\alpha\beta$ - timocita, kod kojih je efekat propranolola bio pojačan. Ovo bi se moglo povezati sa podacima, da timociti ispoljavaju i β_1 -adrenergički receptor (Marchetti i sar., 1994) i da različiti tipovi adrenergičkih receptora u istom tkivu mogu biti različito regulisani u prisustvu/odsustvu polnih hormona (Monjo i sar., 2003). Konačno, kod orhidektomisanih životinja ni ukupan broj T-limfocita u perifernoj krvi, kao ni apsolutan, odnosno relativan broj osnovnih subpopulacija T-ćelija nije bio izmenjen u odgovoru na delovanje propranolola.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovim istraživanjima, moguće je učiniti nekoliko pretpostavki koje bi objasnile izostanak efekata propranolola, kod orhidektomisanih pacova, na diferencijaciju/sazrevanje timocita. Smanjenje koncentracije noradrenalina, kao i smanjeno ispoljavanje β_2 -adrenergičkih receptora, u timusu orhidektomisanih životinja, bi se moglo povezati sa izostankom efekata propranolola na timopoezu. U prilog ovoj pretpostavci idu podaci koji pokazuju da je kod odraslih pacova

orhidektomisanih u neonatalnom uzrastu, kod kojih je koncentracija noradrenalina u timusu smanjena, modulatorno delovanje kateholamina na timopoezu, posredstvom β -adrenergičkih receptora, takođe značajno smanjeno (Leposavić i sar., 2007). Izostanak značajnih promena u procesu diferencijacije/sazrevanja timocita u odgovoru na davanje propranolola u uslovima kada je koncentracija noradrenalina u timusu čak povećana, a usled smanjenog ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora, kao što je opisano kod ženki pacova androgenizovanih u neonatalnom uzrastu (Radojević i sar., 2011), takođe podržava prethodnu pretpostavku. Pored toga, na osnovu podataka koji ukazuju da polni steroidi povećavaju efikasnost prenosa signala posredstvom β -adrenergičkih receptora (Xu i sar., 1993; Morris i Malbon, 1999; Sun i sar., 2011), moglo bi se spekulirati da je, ne samo manja gustina β_2 -adrenergičkog receptora, već i manja efikasnost intracelularnog prenosa signala koji ćelije dobijaju posredstvom ovog tipa receptora, uticala na efikasnost modulatornog delovanja noradrenalina na diferencijaciju/sazrevanje T-ćelija u timusu orhidektomisanih životinja.

Činjenica da je sadržaj noradrenalina u ćelijama strome i nervnim vlaknima timusa bio smanjen, a povećan u timocitima, zahteva dodatno objašnjenje u kontekstu smanjene efikasnosti delovanja propranolola na timopoezu. Izostanak značajnog delovanja propranolola na timopoezu u uslovima povećane sinteze noradrenalina u timocitima bi mogao da implicira da ovo povećanje nije bilo dovoljno da nadoknadi smanjenje njegove sinteze u drugim ćelijama i sledstveno smanjenje koncentracije noradrenalina u mikrookruženju. Alternativno, imajući u vidu manju gustinu β_2 -adrenergičkog receptora na membrani timocita, a moguće i na membrani ćelija strome (s obzirom na smanjenje ekspresije iRNK za ovaj tip adrenergičkog receptora) i moguće smanjenje efikasnosti intracelularnog prenosa signala posredstvom β_2 -adrenergičkog receptora u odsustvu hormona testisa (Xu i sar., 1993; Morris i Malbon, 1999; Sun i sar., 2011), s jedne strane, i podatke koji ukazuju na ne samo parakrino, već i autokrino delovanje kateholamina sintetisanih u timocitima (Leposavić i sar., 2008b), s druge strane, moguće je pretpostaviti da su smanjenoj efikasnosti autokrinog/parakrinog delovanja noradrenalina/kateholamina iz timocita doprinele promene na nivou β_2 -adrenergičkih receptora.

Uz sve prethodno pomenuto, u kontekstu prethodno analiziranog svojstva propranolola da prolazi kroz krvno-moždanu barijeru (Neil-Dwyer i sar., 1981)

(poglavlje 5.9.2., stranica 158) i utiče na otpuštanje liberina i statina iz hipotalamusa i, posleđično, hormona hipofize (Oberbeck i sar., 1999; Daftary i sar., 2000; Cheolyoung i sar., 2003), koji onda direktno, ili indirektno (menjajući sekretornu aktivnost ciljnih žlezda) utiču na timopoezu (Blalock, 1989; Savino i Dardenne, 2000), opravdano je očekivati da promene u delovanju propranolola na timopoezu kod orhidektomisanih pacova nastaju i usled promena u centralnom delovanju ove supstance, a kao posledica izmenjene noradrenergičke transmisije u mozgu, u odsustvu hormona testisa. U prilog ovoj mogućnosti idu podaci koji sugerišu da su za punu maskulinizaciju neurotransmiterskih sistema mozga glodara, uključujući i noradrenergički sistem, neophodne optimalne koncentracije polnih steroidnih hormona ne samo u neonatalnom, već i u peripubertetnom periodu (Wilson i Davies, 2007).

Za potpuno sagledavanje uticaja orhidektomije na modulatorno delovanje kateholamina na proces timopoeze, važno je istaći da nedostatak hormona testisa i tretman propranololom kod neorhidektomisanih životinja pokazuju slične efekte na neke od ključnih procesa u sklopu diferencijacije/sazrevanja timocita, dovodeći, u krajnjem, do povećanja efikasnosti timopoeze. Naime, rezultati dobijeni i kod orhidektomisanih životinja i kod životinja tretiranih propranololom sugerišu povećanje efikasnosti β -selekcije, kao i smanjenje efikasnosti pozitivne i negativne selekcije timocita i, konačno, povećanje procentualne zastupljenosti timocita najzrelijeg CD4+CD8- TCR $\alpha\beta$ ++ JP fenotipa. Pored toga, oba tretmana dovela su do povećanja procentualne zastupljenosti i broja CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u ukupnoj populaciji timocita. Uz sve prethodno navedeno, kod obe grupe životinja, na membrani timocita je uočeno povećanje gustine CD90 molekula, ključnog regulatora procesa negativne selekcije, čije ispoljavanje reguliše noradrenalin, posredstvom β -adrenergičkih receptora, delujući negativno na post-translacionu stabilnost iRNK za ovaj protein (Wajeman-Chao i sar., 1998). Ovi nalazi, u svetlu podataka koji pokazuju da orhidektomija dovodi do smanjenja koncentracije noradrenalina i ispoljavanja β_2 -adrenergičkog receptora u timusu i da davanje propranolola orhidektomisanim pacovima, za razliku od neorhidektomisanih životinja, ne utiče značajno na efikasnost timopoeze, mogli bi da predstavljaju solidnu naučnu osnovu za prepostavku da su promene u timopoezi kod odraslih životinja, kojima su uklonjeni testisi 30. dana života, makar delimično, bile posledica izostanka/manje efikasnosti toničnog inhibitornog

delovanja kateholamina na diferencijaciju/sazrevanje timocita, posredstvom β_2 -adrenergičkog receptora.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, moguće je izvesti sledeće zaključke:

1) timociti, uglavnom zrelog CD3⁺⁺ fenotipa, ali i TEC i MF, sadrže i sintetišu kateholamine, a subpopulacije ovih tipova ćelija ispoljavaju β_2 -adrenergički receptor.

2) u timusu odraslih životinja koje su orhidektomisane u uzrastu od 30 dana:

- smanjuje se koncentracija noradrenalina, usled smanjenja gustine noradrenergičkih nervnih vlakana i ćelija strome koji sintetišu kateholamine, a moguće i sadržaja noradrenalina u njima;
- smanjuje se ekspresija iRNK za β_2 -adrenergički receptor u timocitima i ćelijama strome timusa;
- povećava se efikasnost timopoeze, najverovatnije usled efikasnijeg naseljavanja timusa prekursorima iz kostne srži, efikasnije diferencijacije/sazrevanja najnezrelijih DN TCR $\alpha\beta$ - timocita i β -selekcije, kao i manje efikasnosti negativne selekcije, najverovatnije usled veće gustine CD90 molekula na membrani timocita;
- dolazi do usmeravanja razvoja pozitivno selektovanih timocita ka ćelijama CD4⁺CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺⁺ fenotipa i sledstveno do značajnog povećanja procentualne zastupljenosti svežih timusnih emigranata u okviru populacije CD4⁺ T-ćelija i CD4⁺ ćelija u ukupnoj populaciji T-limfocita u perifernoj krvi;
- dolazi do promena u sazrevanju regulatornih ćelija, koje se ogledaju u smanjenju procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ćelija u ukupnoj populaciji timocita i CD25⁺Foxp3⁺ ćelija unutar subpopulacije CD4⁺ timocita i povećanju procentualne zastupljenosti CD8⁺CD161⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ ćelija u ukupnoj populaciji timocita i CD161⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ ćelija u subpopulaciji CD8⁺ timocita, uz povećanje procentualne zastupljenosti Treg ćelija u okviru populacije CD4⁺ limfocita i smanjenje procentualne zastupljenosti NKT ćelija u populaciji CD8⁺ limfocita periferne krvi, što, najverovatnije, ukazuje na promene u stvaranju/preživljavanju ćelija odgovarajućih fenotipova na periferiji;

3) četrnaestodnevni tretman propranololom, u timusu odraslih neorhidektomisanih pacova:

- smanjuje koncentraciju noradrenalina, najverovatnije usled manjeg sadržaja noradrenalina u simpatičkim nervnim vlaknima, manje gustine ćelija strome koje sadrže kateholamine i manjeg sadržaja noradrenalina u timocitima i, moguće, u ćelijama strome timusa;
- smanjuje ekspresiju iRNK za β_2 -adrenergički receptor;
- povećava efikasnost timopoeze, tako što povećava efikasnost ranih faza diferencijacije/sazrevanja DN TCR $\alpha\beta$ - ćelija i, najverovatnije, β -selekcije, a smanjuje efikasnost negativne selekcije, najverovatnije tako što, kao i orhidektomija, povećava gustinu CD90 molekula na membrani timocita;
- povećava procentualnu zastupljenost CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ ++ i, posebno, CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ ++ ćelija, što dovodi do povećanja procentualne zastupljenosti svežih timusnih emigranata u okviru populacija CD4+ i CD8+ T-ćelija, ali ne utiče na procentualnu zastupljenost CD4+ i CD8+ ćelija u ukupnoj populaciji T-limfocita u perifernoj krvi, što ukazuje da ovaj tretman dovodi do promena i na periferiji;
- povećava efikasnost diferencijacije/sazrevanja regulatornih ćelija, sudeći prema većem procentu CD4+CD25+Foxp3+ ćelija u suspenziji timocita i CD25+Foxp3+ ćelija unutar subpopulacije CD4+ timocita i povećanju procenta CD8+CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija u suspenziji timocita i CD161+TCR $\alpha\beta$ + ćelija unutar subpopulacije CD8+ timocita, i dovodi do povećanja procentualne zastupljenosti Treg ćelija u populaciji CD4+ limfocita, a ne utiče na procentualnu zastupljenost NKT ćelija u okviru populacije CD8+ limfocita periferne krvi, što ukazuje da ovaj tretman deluje na preživljavanje/stvaranje NKT ćelija van timusa.

4) četrnaestodnevni tretman propranololom kod odraslih pacova, orhidektomisanih u uzrastu od 30 dana, nije značajno uticao na:

- koncentraciju noradrenalina i ispoljavanje β_2 -adrenergičkog receptora u timusu;
- efikasnost timopoeze, pa sledstveno ni na zastupljenost svežih timusnih emigranata u okviru glavnih populacija T-ćelija periferne krvi, najverovatnije kao posledica smanjene efikasnosti modulatornog delovanja kateholamina, posredstvom β_2 -adrenergičkog receptora.

Generalno, istraživanja sprovedena u okviru ove disertacije su pokazala da se kod pacova, u odsustvu muških polnih hormona, počevši od 30. dana života, značajno povećava stvaranje T-ćelija u timusu, ali i da dolazi do kvalitativnih promena u procesu timopoeze, koje se ogledaju u većem stvaranju ćelija CD4⁺ i CD8⁺CD161⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ fenotipova, delimično usled značajno manje efikasnosti/izostanka toničnog inhibitornog delovanja kateholamina, posredstvom β_2 -adrenergičkog receptora, na timopoezu, zbog promena u metabolizmu kateholamina u nervnim vlaknima i ćelijama timusa i ispoljavanju β_2 -adrenergičkog receptora u ćelijama timusa. Drugim rečima, i u timusu, kao u drugim tkivima (Wilson i Davies, 2007), kateholamini bi se mogli posmatrati kao medijatori delovanja hormona testisa.

7. LITERATURA.

- Aaltonen J. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 1997;17:399-403.
- Aarons RD, Nies AS, Gal J, Hegstrand LR, Molinoff PB. Elevation of β -adrenergic receptor density in human lymphocytes after propranolol administration. *J Clin Invest* 1980;65:949-957
- Aarons RD, Molinoff PB. Changes in the density of beta adrenergic receptors in rat lymphocytes, heart and lung after chronic treatment with propranolol. *JPET* 1982;221:439-443.
- Aboudkhil S, Bureau JP, Garrelly L, Vago P. Effects of castration, Depo-testosterone and cyproterone acetate on lymphocyte T subsets in mouse thymus and spleen. *Scand J Immunol* 1991;34:647-653.
- Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 2001;15:659-669.
- Ahn S, Lee G, Yang SJ, Lee D, Lee S, Shin HS, Kim MC, Lee KN, Palmer DC, Theoret MR, Jenkinson EJ, Anderson G, Restifo NP, Kim MG. TSCOT+ thymic epithelial cell-mediated sensitive CD4 tolerance by direct presentation. *PLoS Biol* 2008;6:e191.
- Alexander WH, Stimson WH. Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitol Today* 1988;4:189-193.
- Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem* 2004;279:15396-15401.
- Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D, Meraz A, Bhandoola A. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* 2003;4:168-174.
- Alshamsan A. Paradoxical signaling pathways in developing thymocytes *J Pharm Pharm Sci* 2011;14:378-386.

- Al-Shawaf AA, Kendal DM, Cowen T. Identification of neural profiles containing vasoactive intestinal polypeptide, acetylcholinesterase and catecholamines in the rat thymus. *J Anat* 1991;174:131-143.
- Al-Wadei MH, Al-Wadei HA, Schuller HM. Pancreatic cancer cells and normal pancreatic duct epithelial cells express an autocrine catecholamine loop that is activated by nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 3$, $\alpha 5$, and $\alpha 7$. *Mol Cancer Res* 2012;10:239-249.
- Amenta F, Bronzetti E, Cantalamessa F, El-Assouad D, Felici L, Ricci A, Tayebati SK. Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2001;117:133-142.
- Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 2001;1:31-40.
- Andrew D, Aspinall R. IL-7 and not stem cell factor reverses both the increase in apoptosis and the decline in thymopoiesis seen in aged mice. *J Immunol* 2001;166:1524-1530.
- Ansar Ahmed S, Dauphinee MJ, Talal N. Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice. *J Immunol* 1985;134:204-210.
- Ansar Ahmed S, Talal N. Sex hormones and the immune system: Part 2. Animal data. *Bailliere's Clin Rheum* 1990;4:13-31.
- Arbogast LA, Voogt JL. Progesterone suppresses tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nucleus on proestrus. *Endocrinology* 1994;135:343-350.
- Ardavin C. Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 1997;18:350-361.
- Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, Rolink A, Klein L. Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 2007;8:351-358.
- Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, Van Kaer L, Pircher HP, Zinkernagel RM, Tonegawa S. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 1994;76:651-663.
- Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol* 2000;18:309-345.

- Bhandoola A, Sambandam A. From stem cell to T cell: one route or many? *Nat Rev Immunol* 2006;6:117-126.
- Baker SP, Katovich MJ. Chronic propranolol treatment decreases cardiac beta-adrenoceptors in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1982;78:479-482.
- Banks WA, Ortiz L, Plotkin SR, Kastin AJ. Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;259:988-996.
- Banks W. 1993. *Applied Veterinary Histology*. Mosby.
- Barnard AL, Chidgey AP, Bernard CC, Boyd RL. Androgen depletion increases the efficacy of bone marrow transplantation in ameliorating experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 2009;113:204-213.
- Basu S, Dasgupta PS. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J Neuroimmunol* 2000;102:113-124.
- Bayer AL, Lee JY, de la Barrera A, Surh CD, Malek TR. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+T regulatory cells. *J Immunol* 2008;181:225-234.
- Beato M, Sanchez-Pacheco A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 1996;17:587-609.
- Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000;6:225-236.
- Becker JB. 1992. Hormonal influences on extrapyramidal sensorimotor function and hippocampal plasticity. In: *Behavioral Endocrinology* Eds Becker JB, Breedlove SM, Crews D, Eds. MIT Press, Cambridge.
- Bellinger DL, Felten SY, Felten DL Maintenance of noradrenergic sympathetic innervation in the involuted thymus of the aged Fischer 344 rat. *Brain Behav Immun* 1988;2:133-150.
- Bellinger DL, Lorton D, Felten SY, Felten DL Innervation of lymphoid organs and implications in development, aging, and autoimmunity. *Int J Immunopharmacol* 1992;14:329-344.
- Bellinger DL, Madden KS, Lorton, D, ThyagaRajan S, Felten DL. 2001. Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in

- immunosenescence. In: Psychoneuroimmunology. Vol. 1. Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. Academic Press.
- Bencsics A, Sershen H, Baranyi M, Hashim A, Lajtha A, Vizi ES. Dopamine, as well as norepinephrine, is a link between noradrenergic nerve terminals and splenocytes. *Brain Res* 1997;761:236-243.
- Bendelac A, Matzinger P, Seder RA, Paul WE, Schwartz RH. Activation events during thymic selection. *J Exp Med* 1992;175:731-742.
- Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:297-336.
- Bendriss-Vermare N, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Mouliau N, Berrih-Aknin S, Caux C, Trinchieri G, Brière F. Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 2001;107:835-844.
- Benlagha K, Kiyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 2002;296:553-555.
- Bennett AR, Farley A, Blair NF, Gordon J, Sharp L, Blackburn CC. Identification and characterization of thymic epithelial progenitor cells. *Immunity* 2002;16:803-814.
- Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris CE, Mossmann H, Wunderlich F. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J* 1999;13:123-133.
- Benz C, Heinzl K, Bleul CC. Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *Eur J Immunol* 2004;34:3652-3663.
- Bergquist J, Silberring J. Identification of catecholamines in the immune system by electro-spray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:683-688.
- Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, Ewing, A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12912-12916.

- Bergquist J, Josefsson E, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A. Measurements of catecholamine-mediated apoptosis of immunocompetent cells by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1997;18:1760-1766.
- Bergquist J, Tarkowski A, Ewing A, Ekman R. Catecholaminergic suppression of immunocompetent cells. *Immunol Today* 1998;19:562-567.
- Berzins SP, McNab FW, Jones CM, Smyth MJ, Godfrey DI. Long-term retention of mature NK1.1+ NKT cells in the thymus. *J Immunol* 2006;176:4059-4065.
- Besedovsky HO, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17:64-93.
- Biegan A. Effects of steroid hormones on the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci* 1990;600:427-432.
- Bijlsma JWJ, Straub RH, Masi AT, Lahita RG, Cutolo M. Neuroendocrine immune mechanisms in rheumatic diseases. *Trends Immunol* 2002;23:59-61.
- Bjorses P, Halonen M, Palvimo JJ, Kolmer M, Aaltonen J, Ellonen P, Perheentupa J, Ulmanen I, Peltonen L. Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein. *Am J Hum Genet* 2000;66:378-392.
- Blackburn CC, Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol* 2004;4:278-289.
- Blackburn CC, Augustine CL, Li R, Harvey RP, Malin MA, Boyd RL, Miller JF, Morahan G. The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5742-5746.
- Blalock JE. A molecular basis for communication between immune and neuroendocrine system. *Physiol Rev* 1989;69:1-32.
- Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE.. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. *In Vivo* 1997;11:421-440.
- Bodey B, Bodey Jr B, Siegel SE, Kaiser HE. Novel insights into the function of the thymic Hassall's bodies. *In Vivo* 2000;14:407-418.
- Bommhardt U, Beyer M, Hünig T, Reichardt HM. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:263-280.

- Botham CA, Jones GV, Kendall MD. Immuno-characterisation of neuroendocrine cells of the rat thymus gland in vitro and in vivo. *Cell Tissue Res* 2001;303:381-389.
- Boursalian TE, Golob J, Soper DM, Cooper CJ, Fink PJ. Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat Immunol* 2004;5:418-425.
- Bouso P, Bhakta NR, Lewis RS, Robey E. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 2002;296:1876-1880.
- Boyd RL, Tucek CL, Godfrey DI, Izon DJ, Wilson TJ, Davidson NJ, Bean AG, Ladyman HM, Ritter MA, Hugo P. The thymic microenvironment. *Immunol Today* 1993;14:445-459.
- Breedlove SM. Sexual dimorphism in the vertebrate nervous system. *J Neurosci* 1992;12:4133-4142.
- Brelińska R. Thymic epithelial cells in age-dependent involution. *Microsc Res Tech* 2003;62:488-500.
- Brennan PJ, Tatituri RV, Brigl M, Kim EY, Tuli A, Sanderson JP, Gadola SD, Hsu FF, Besra GS, Brenner MB: Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol* 2011;12:1202-1211.
- Brigl M, van den Elzen P, Chen X, Meyers JH, Wu D, Wong CH, Reddington F, Illarianov PA, Besra GS, Brenner MB, Gumperz JE. Conserved and heterogeneous lipid antigen specificities of Cd1d-restricted NKT cell receptors. *J Immunol* 2006;176:3625-3634.
- Brodde OE, Michel MC, Gordon EP, Sandoval A, Gilbert EM, Bristow MR. Beta-adrenoceptor regulation in the human heart: can it be monitored in circulating lymphocytes? *Eur Heart J*.1989;10:2-10.
- Brodde OE, Daul A, Michel MC. Subtype-selective modulation of human beta 1- and beta 2-adrenoceptor function by beta-adrenoceptor agonists and antagonists. *Clin Physiol Biochem* 1990;8 Suppl 2:11-17.
- Brown SW, Meyers RT, Brennan KM, Rumble JM, Narasimhachari N, Perozzi EF, Ryan JJ, Stewart JK, Fischer-Stenger K. Catecholamines in a macrophage cell line. *J Neuroimmunol* 2003;135:47-55.
- Brugnera E, Bhandoola A, Cibotti R, Yu Q, Guinter TI, Yamashita Y, Sharrow SO, Singer A. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes

- initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 2000;13:59-71.
- Brunet I, Weintz C, Piper M, Trembleau A, Volovitch M, Harris W, Prochiantz A, Holt C. The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 2005;438, 94-98.
- Bulloch K, Pomerantz W. Autonomic nervous system innervation of thymic-related lymphoid tissue in wildtype and nude mice. *J Comp Neurol* 1984;228:57-68.
- Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CW, Vegoe AL, Hsieh CS, Jenkins MK, Farrar MA. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 2008;28:112-121.
- Bustamante D, Lara H, Belmar J. Changes of norepinephrine levels, tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase activities after castration and testosterone treatment in vas deferens of adult rats. *Biol Reprod* 1989;40:541-548.
- Butchers PR, Vardey CJ, Johnson M. Salmeterol: a potent and long-acting inhibitor of inflammatory mediator release from human lung. *Br J Pharmacol* 1991;104:672-676.
- Cano G, Sved AF, Rinaman L, Rabin BS, Card JP. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing. *J Comp Neurol* 2001;439:1-18.
- Carlson CM, Endrizzi BT, Wu JW, Ding XM, Weinreich MA, Walsh ER, Wani MA, Lingrel JB, Hogquist KA, Jameson SC. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* 2006;442:299-302.
- Casale TB, Kaliner M. Demonstration that circulating human blood cells have no detectable alpha 1-adrenergic receptors by radioligand binding analysis. *J Allergy Clin Immunol* 1984;74:812-818.
- Castillo EF, Acero LF, Stonier SW, Zhou D, Schluns KS. Thymic and peripheral microenvironments differentially mediate development and maturation of iNKT cells by IL-15 transpresentation. *Blood* 2010;116:2494-2503.
- Cavallotti C, Artico M, Cavallotti D. Occurrence of adrenergic nerve fibers and of noradrenaline in thymus gland of juvenile and aged rats. *Immunol Lett* 1999;70:53-62.

- Chan SH, Cosgrove D, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell* 1993;73:225-236.
- Chan SH, Waltzinger C, Baron A, Benoist C, Mathis D. Role of coreceptors in positive selection and lineage commitment. *EMBo J* 1994;13:4482-4489.
- Chen WF, Fischer M, Frank G, Zlotnik A. Distinct patterns of lymphokine requirement for the proliferation of various subpopulations of activated thymocytes in a single cell assay. *J Immunol* 1989;143:1598-1605.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-1886.
- Cheolyoung P, Inmyung Y, Jeongtaek W, Sungwoon K, Jinwoo K, Youngseol K, Seungjoon P. Acute hyperglycemia and activation of the beta-adrenergic system exhibit synergistic inhibitory actions on growth hormone (GH) releasing hormone-induced GH release. *Eur J Endocrinol* 2003;148:635-640.
- Chun T, Page MJ, Gapin L, Matsuda JL, Xu H, Nguyen H, Kang HS, Stanic AK, Joyce S, Koltun WA, Chorney MJ, Kronenberg M, Wang CR. CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells. *J Exp Med* 2003;197:907-918.
- Cikota B, Janezić A, Magić Z. Quantification of gene expression using the polymerase chain reaction. *Vojnosanit Pregl* 2002;59:551-556.
- Cohen JH, Danel L, Cordier G, Saez S, Revillard JP. Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. *J Immunol* 1983;131:2767-2771.
- Čolić M, Gašić S, Stojanović N, Popović L, Dujić A. Phenotypic and ultrastructural characterization of an epithelial cell line established from rat thymic cultures. *Immunology* 1992;77:201-207.
- Čolić M, Vučević D, Miyasaka M, Tamatani T, Pavlović MD, Dujić A. Adhesion molecules involved in the binding and subsequent engulfment of thymocytes by a rat thymic epithelial cell line. *Immunology* 1994;83:449-456.

- Collins S, Quarmby VE, French FS, Lefkowitz, Caron MG. Regulation of the β 2-adrenergic receptors and its mRNA in the rat ventral prostate by testosterone. *FEBS Lett* 1988;233:173-176.
- Collins S, Caron M, Lefkowitz RJ. Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression. *Annu Rev Physiol* 1991;53:497-508.
- Cook-Mills MJ, Cohen RL, Perlan RL, Chambers DA. Inhibition of lymphocyte activation by catecholamines: evidence for non-classical mechanisms of catecholamine action. *Immunology* 1995;85:544-549.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 1998;19:323-362.
- Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Marino F, Rasini E, Maestroni GJM, Conti A, Boveri M, Lecchini S, Frigo G. HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. *Life Sci* 2000;68:283-295.
- Cosentino M, Marino F, Bombelli R, Ferrari M, Rasini E, Lecchini S, Frigo G. Stimulation with phyto-haemagglutinin induces the synthesis of catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells: role of protein kinase C and contribution of intracellular calcium. *J Neuroimmunol* 2002;125:125-133.
- Cosentino M, Marino F, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Unravelling dopamine (and catecholamine) physiopharmacology in lymphocytes: open questions. *Trends Immunol* 2003;24:581-582.
- Cosentino M, Fietta AM, Ferrari M, Rasini E, Bombelli R, Carcano E, Saporiti F, Meloni F, Marino F, Lecchini S. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood* 2007;109:632-642.
- Cutolo M, Villaggio B, Craviotto C, Pizzorni C, Serio B, Sulli A. Sex hormones and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2002;1:284-289.
- Daftary SS, Boudaba C, Tasker JG. Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience* 2000;96:743-751.

- Damoiseaux JG, Cautain B, Bernard I, Mas M, van Breda Vriesman PJ, Druet P, Fournié G, Saoudi A. A dominant role for the thymus and MHC genes in determining the peripheral CD4/CD8 T cell ratio in the rat. *J Immunol* 1999;163:2983-2989.
- Daniels MA, Teixeira E, Gill J, Hausmann B, Roubaty D, Holmberg K, Werlen G, Holländer GA, Gascoigne NR, Palmer E. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 2006;444:724-729.
- Das R, Sant'Angelo DB, Nichols KE. Transcriptional control of invariant NKT cell development. *Immunol Rev* 2010;238:195-215.
- Davis CB, Killeen N, Crooks ME, Raulet D, Littman DR. Evidence for a stochastic mechanism in the differentiation of mature subsets of T lymphocytes. *Cell* 1993;73:237-247.
- Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2001;2:1032-1039.
- Derbinski J, Gäbler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenhausen M, Peltonen L, Walter J, Kyewski B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* 2005;202:33-45.
- Desai KV, Michalowska AM, Kondaiah P, Ward JM, Shih JH, Green JE. Gene Expression Profiling Identifies a Unique Androgen-Mediated Inflammatory/Immune Signature and a PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10)-Mediated Apoptotic Response Specific to the Rat Ventral Prostate. *Mol Endocrinol* 2004;18:2895-2907.
- Desi I, Varga L, Dobrony I, Saklenerik GY. Immunotoxicological investigations of the effect of pesticide cypermethrin. *Arch Toxicol* 1985;8:300-304.
- De Waal EJ, Rademakers LH. Heterogeneity of epithelial cells in the rat thymus. *Microsc Res Tech* 1997;38:227-236.
- DiGiovanni L, Austin R, Phillippe M. Steroid hormone modulation of cAMP production in response to beta adrenergic receptor stimulation in genital tract myocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992;28:509-514.
- Dimitrijević M, Pilipović I, Stanojević S, Mitić K, Radojević K, Pešić V, Lepasavić G. Chronic propranolol treatment affects expression of adrenoceptors on peritoneal

- macrophages and their ability to produce hydrogen peroxide and nitric oxide. *J Neuroimmunol* 2009;211:56-65.
- Dion ML, Sékaly RP, Cheynier R. Estimating thymic function through quantification of T-cell receptor excision circles. *Methods Mol Biol* 2007;380:197-213.
- Donlon MW, Hunt A, Catravas GN, Kaliner M. A characterization of beta-adrenergic receptors on cellular and perigranular membranes of rat peritoneal mast cells. *Life Sci* 1982;31:411-416.
- Dulos GJ, Bagchus WM. Androgens indirectly accelerate thymocyte apoptosis. *Int Immunopharmacol* 2001;1:321-328.
- Dupin E, Maus M, Fauquet M. Regulation of the quail tyrosine hydroxylase gene in neural crest cells by cAMP and beta-adrenergic ligands. *Dev Biol* 1993;159:75-86.
- Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L, Bendelac A, Littman DR. Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity* 2005;22:705-716.
- El Chami N, Ikhlef F, Kaszas K, Yakoub S, Tabone E, Siddeek B, Cunha S, Beaudoin C, Morel L, Benahmed M, Régnier DC. Androgen-dependent apoptosis in male germ cells is regulated through the proto-oncoprotein Cbl. *J Cell Biol* 2005;171:651-661.
- Elenkov IJ., Wilder RL., Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve - an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000;52:595-638.
- Elwan MA, Sakuragawa N. Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport* 1997;8:3435-3438.
- Engel I, Kronenberg M. Making memory at birth: understanding the differentiation of natural killer T cells. *Curr Opin Immunol* 2012;24:184-190.
- Engler KL, Rudd ML, Ryan JJ, Stewart JK, Fischer-Stenger K. Autocrine actions of macrophage-derived catecholamines on interleukin-1 β . *J Neuroimmunol* 2005;160:87-91.
- Ernst B, Surh CD, Sprent J. Thymic selection and cell division. *J Exp Med* 1995;182:961-971.

- Faraj BA, Olkowski ZL, Jackson RT. Binding of [3H]-dopamine to human lymphocytes: possible relationship to neurotransmitter uptake sites. *Pharmacology* 1991;42:135-141.
- Faro J, Velasco S, González-Fernández A, Bandeira A. The impact of thymic antigen diversity on the size of the selected T cell repertoire. *J Immunol* 2004;172:2067-2075.
- Farr AG, Dooley JL, Erickson M. Organization of thymic medullary epithelial heterogeneity: implications for mechanisms of epithelial differentiation. *Immunol Rev* 2002;189:20-27.
- Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4⁽⁺⁾ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 2004;114:1209-1217.
- Fehsel K, Kroncke KD, Kolb H, Kolb-Bachofen V. In situ nick-translation detects focal apoptosis in thymuses of glucocorticoid- and lipopolysaccharide-treated mice. *J Histochem Cytochem* 1994;42:613-619.
- Felten DL, Felten SY. Innervation of the thymus. *Thymus* 1989;2:73-88.
- Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Olschowka JA, Livnat S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol* 1985;135:755-765.
- Fink PJ, Hendricks DW. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. *Nat Rev Immunol* 2011;11:544-549.
- Fisher SA, Absher M. Norepinephrine and ANG II stimulate secretion of TGF-beta by neonatal rat cardiac fibroblasts in vitro. *Am J Physiol* 1995;268:910-917.
- Fitzpatrick FTA, Greenstein BD. Effects of various steroids on the thymus, spleen, ventral prostate and seminal vesicles in old orchidectomized rats. *J Endocrinol* 1987;113:51-55.
- Flatmark T. Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand* 2000;168:1-17.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, Ward PA. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 2007;449:721-725.

- Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA. Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med*;2008;14:195-204.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Sarma JV, Day DE, Lentsch AB, Huber-Lang MS, Ward PA. Upregulation of Phagocyte-Derived Catecholamines Augments the Acute Inflammatory response. *PLoS One* 2009;4:e4414.
- Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 2005a;202:901-906.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005b;6:1142-1151.
- Foss DL, Donskoy E, Goldschneider I. The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med* 2001;193:365-374.
- Friedman EM, Irwin MR. Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. *Pharmacol Ther* 1997;74:27-38.
- Fuchs BA, Albright JW, Albright JF. β -adrenergic receptors on murine lymphocytes: density varies with cell maturity and lymphocyte subtype and is decreased after antigen administration. *Cell Immunol* 1988;114:231-245.
- Gabler J, Arnold J, Kyewski B. Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* 2007;37:3363-3372.
- Gabor MJ, Godfrey DI, Scollay R. Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes. *Eur J Immunol* 1997;27:2010-2015.
- Gadue P, Stein PL. NK T cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require I κ k for efficient maturation. *J Immunol* 2002;169:2397-2406.
- Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 2004;200:1039-1049.
- Gapin L, Matsuda JL, Surh CD, Kronenberg M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2001;2:971-978.
- Garman RD, Jacobs KA, Clark SC, Raulet DH. B-cell-stimulatory factor 2 (β_2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7629-7633.

- Ge Q, Chen WF. Phenotypic identification of the subgroups of murine T-cell receptor $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ thymocytes and its implication in the late stage of thymocyte development. *Immunology* 1999;97:665-671.
- Germain RN. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2002;2:309-322.
- Gill J, Malin M, Hollander GA, Boyd R. Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24(+) thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 2002;3:635-642.
- Gill J, Malin M, Sutherland J, Gray D, Hollander G, Boyd R. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev* 2003;195:28-50.
- Godfrey DI, Berzins SP. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;7:505-518.
- Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. 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* 1993;150:4244-4252.
- Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004;4:231-237.
- Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* 2010;11:197-206.
- Gogal RM Jr, Smith BJ, Kalnitsky J, Holladay SD. Analysis of apoptosis of lymphoid cells in fish exposed to immunotoxic compounds. *Cytometry* 2000;39:310-318.
- Goldfien A. 2001. Adrenal medulla. In: *Basic and Clinical Endocrinology*. Greenspan FS, Gardner DG, Eds. Lange Medical Books, McGraw-Hill.
- Goldberg GL, Sutherland JS, Hammet MV, Milton MK, Heng TS, Chidgey AP, Boyd RL. Sex steroid ablation enhances lymphoid recovery following autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2005;80:1604-1613
- Goldstein ME, Tank AW, Fossom LH, Hamill RW. Molecular aspects of the regulation of tyrosine hydroxylase by testosterone. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;14:79-86.

- Gommeaux J, Gregoire C, Nguessan P, Richelme M, Malissen M, Guerder S, Malissen B, Carrier A. Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4⁺ thymocytes. *Eur J Immunol* 2009;39:956-964.
- Gordon J, Barnes NM. Lymphocytes transport serotonin and dopamine: agony or ecstasy? *Trends Immunol* 2003;24:438-443.
- Gossens K, Naus S, Corbel SY, Lin S, Rossi FM, Kast J, Ziltener HJ. Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *J Exp Med* 2009;206:761-778.
- Graff RJ, Lappe MA, Snell GD. The influence of the gonads and adrenal glands on the immune response to skin grafts. *Transplantation* 1969;7:105-111.
- Gray D, Abramson J, Benoist C, Mathis D. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J Exp Med* 2007;204:2521-2528.
- Greenstein BD, Fitzpatrick FTA, Adcock IM, Kendall MD, Wheeler MJ. Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone. *J Endocrinol* 1986;110:417- 422.
- Guevara Patiño JA, Marino MW, Ivanov VN, Nikolić-Žugić J. Sex steroids induce apoptosis of CD8⁺CD4⁺ double-positive thymocytes via TNF- α . *Eur J Immunol* 2000;30:2586-2592.
- Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol* 1993;47:169-176.
- Haas J, Fritzsching B, Trubswetter P, Korporal M, Milkova L, Fritz B, Vobis D, Krammer PH, Suri-Payer E, Wildemann B. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007;179:1322-1330.
- Hadcock JR, Rod M, Malbon C Agonist Regulation of β -AdrenergicR eceptor mRNA Analysis in S49 mouse lymphoma mutants *J Biol Chem* 1989a;264:13956-13961.
- Hadcock JR, Wang H, Malbon CC. Agonist-induced destabilization of beta-adrenergic receptor mRNA. Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of beta-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 1989b;264:19928-19933.
- Hale JS, Boursalian TE, Turk GL, Fink PJ. Thymic output in aged mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:8447-8452.

- Haley PJ. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* 2003;188:49-71.
- Hamill RW, Schroeder B. Hormonal regulation of adult sympathetic neurons: the effects of castration on neuropeptide Y, norepinephrine, and tyrosine hydroxylase activity. *J Neurobiol* 1990;21:731-742.
- Hamill RW, Earley CJ, Guernsey LA. Hormonal regulation of adult sympathetic neurons: the effects of castration on tyrosine hydroxylase activity. *Brain Res* 1984;299:331-337.
- Hare KJ, Wilkinson RW, Jenkinson EJ, Anderson G. Identification of a developmentally regulated phase of postselection expansion driven by thymic epithelium. *J Immunol* 1998;60:3666-3672.
- Hasko G, Elenkov IJ, Vizi ES. Presynaptic receptors involved in the modulation of release of noradrenaline from the sympathetic nerve terminals of the rat thymus. *Immunol Lett* 1995;47:133-137.
- Haynes L, Maue AC. Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol* 2009;21:414-417.
- Heino M, Peterson P, Kudoh J, Nagamine K, Lagerstedt A, Ovod V, Ranki A, Rantala I, Nieminen M, Tuukkanen J, Scott HS, Antonarakis SE, Shimizu N, Krohn K. Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in the thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:821-825.
- Heng TS, Goldberg GL, Gray DH, Sutherland JS, Chidgey AP, Boyd RL. Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution. *J Immunol* 2005;175:2982-2993.
- Hinterberger M, Aichinger M, da Costa OP, Voehringer D, Hoffmann R, Klein L. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat Immunol* 2010;11:512-519.
- Hlavacek WS, Redondo A, Wofsy C, Goldstein B. Kinetic proofreading in receptor-mediated transduction of cellular signals: receptor aggregation, partially activated receptors, and cytosolic messengers. *Bull Math Biol* 2002;64:887-911.
- Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 1994;76:17-27.

- Hong C, Luckey MA, Park JH. Alpha intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development. *Semin Immunol* 2012;24:151-158.
- Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2004;6:745-751.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061.
- Hosseinzadeh H, Goldschneider I. Recent thymic emigrants in the rat express a unique antigenic phenotype and undergo post-thymic maturation in peripheral lymphoid tissues. *J Immunol* 1993;150:1670.
- Houston EG Jr, Boursalian TE, Fink PJ. Homeostatic signals do not drive post-thymic T cell maturation. *Cell Immunol* 2012;274:39-45.
- Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K, Yahata T, Ando K, Zuklys S, Holländer GA, Shima DT, Habu S. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* 2008;205:2507-2513.
- Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 2006;7:401-410.
- Huang J, Weiss ML. Characterization of the central cell groups regulating the kidney in the rat. *Brain Res* 1999;845:77-91.
- Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan M, Josien R. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 2004;172:7485-7494.
- Hughes RJ, Mahan LC, Insel PA. Certain beta-blockers can decrease beta-adrenergic receptor number: II. Down-regulation of receptor number by alprenolol and propranolol in cultured lymphoma and muscle cells. *Circ Res* 1988;63:279-285.
- Hueber AO, Bernard AM, Battari CL, Marguet D, Massol P, Foa C, Brun N, Garsia S, Steward C, Pierres M, He HT. Thymocytes in Thy-1^{-/-} mice show augmented TCR signalling and impaired differentiation. *Curr Biol* 1997;7:705-708.
- Hünig T, Torres-Nagel N, Mehling B, Park HJ, Herrmann T. Thymic development and repertoire selection: the rat perspective. *Immunol Rev* 2001;184:7-19.

- Ioannidis V, Beermann F, Clevers H, Held W. The beta-catenin-TCF-1 pathway ensures CD4+CD8+ thymocyte survival. *Nat Immunol* 2001;2:691-697
- Irving BA, Alt FW, Killeen N. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* 1998;280:905-908.
- Itano A, Salmon P, Kioussis D, Tolaini M, Corbella P, Robey E. The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells. *J Exp Med* 1996;183:731-741.
- Itoh M, Taksahi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162:5317-5326.
- Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* 1995;13:93-126.
- Jefferies WA, Green JR, Williams AF. Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. *J Exp Med* 1985;162:117-127.
- Jeong H, Kim MS, Kwon J, Kim KS, Seol W. Regulation of the transcriptional activity of the tyrosine hydroxylase gene by androgen receptor. *Neurosci Lett* 2006;396:57-61.
- Jiang JL, Peng YP, Qiu YH, Wang JJ. Adrenoreceptor-coupled signal-transduction mechanisms mediating lymphocyte apoptosis induced by endogenous catecholamines. *J Neuroimmunol* 2009;213:100-111.
- Johnston JP. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol* 1968;17:1285-1297.
- Jones GV, Botham CA, Clarke AG, Kendall MD. Immunoreactivity of neural crest-derived cells in thymic tissue developing under the rat kidney capsule. *Brain Behav Immun* 1998;12:163-180.
- Josefsson E, Bergquist J, Ekman R, Tarkowski A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology* 1996;88:140-146.
- Jotereau F, Heuze F, Salomon-Vie V, Gascan H. Cell kinetics in the fetal mouse thymus: precursor cell input, proliferation, and emigration. *J Immunol* 1987;138:1026-1030.

- Kaliner M, Orange RP, Austen KF. Immunological release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis from human lung. VI Enhancement of cholinergic and alpha adrenergic stimulation. *J Exp Med* 1972;136:556-670.
- Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987;49:273-280.
- Karapetrović B, Mičić M, Leposavić G. Stereological analysis of the sexually mature rat thymus after orchidectomy. *Indian J Med Res* 1995;102:42-48.
- Karsunky H, Inlay MA, Serwold T, Bhattacharya D, Weissman IL. Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood* 2008;111:5562-5570.
- Kato S. Thymic microvascular system. *Microsc Res Tech* 1997;38:287-299.
- Kavelaars A. Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system. *Brain Behav Immun* 2002;16:799-807.
- Kawata M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res* 1995;24:1-46.
- Keast JR. Effects of testosterone on pelvic autonomic pathways: progress and pitfalls. *J Auton Nerv Syst* 2000;79:67-73.
- Kendall MD. The cell biology of cell death in the thymus. *Thymus Update* 1990;3:47-70.
- Kendall MD. Functional anatomy of the thymic microenvironment. *J Anat* 1991;177:1-29.
- Kendall MD, Al-Shawaf AA. Innervation of the rat thymus gland. *Brain Behav Immun* 1991;5:9-28.
- Kendall MD, Al-Shawaf A, Zaidi SA. The cholinergic and adrenergic innervation of the rat thymus. *Adv Exp Med Biol* 1988;237:255-261.
- Kendall MD, Atkinson BA, Muñoz FJ, de la Riva C, Clarke AG, von Gaudecker B. The noradrenergic innervation of the rat thymus during pregnancy and in the post partum period. *J Anat* 1994;185:617-625.
- Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S, Peschon JJ. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 2000;191:771-780.

- Kim BJ, Jones HP. Epinephrine-primed murine bone marrow-derived dendritic cells facilitate production of IL-17A and IL-4 but not IFN- γ by CD4⁺ T cells. *Brain Behav Immun* 2010;24:1126-1136.
- Kin NW, Sanders VM. It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol* 2006;79:1093-1104.
- Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 1988;335:730-733.
- Kiyoteru I. Modulation of adenosine 3', 5'-monophosphate contents of rat peritoneal macrophages mediated by β 2-adrenergic receptors. *Biochem Pharmacol* 1977;26:1813-1816.
- Klein L. Dead man walking: how thymocytes scan the medulla. *Nat Immunol* 2009;10:809-811.
- Klein L, Jovanovic K. Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Semin Immunol* 2011;23:401-409.
- Klein L, Roettinger B, Kyewski B. Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance. *Eur J Immunol* 2001;31:2476-2486.
- Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009;9:833-844.
- Klug DB, Carter C, Crouch E, Roop D, Conti CJ, Richie ER. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11822-11827.
- Klug DB, Carter C, Gimenez-Conti IB, Richie ER. Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J Immunol* 2002;169:2842-2845.
- Kobilka B. Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 1992;15:87-114.
- Koble C, Kyewski B. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med* 2009;206:1505-1513.

- Koch U, Fiorini E, Benedito R, Besseyrias V, Schuster-Gossler K, Pierres M, Manley NR, Duarte A, Macdonald HR, Radtke F. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med* 2008;205:2515-2523.
- Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4⁺ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol Rev* 2001;53:487-525.
- Komura H, Iwaki M. Pharmacokinetics and metabolism of metoprolol and propranolol in the female DA and female Wistar rat: the female DA rat is not always an animal model for poor metabolizers of CYP2D6. *J Pharm Sci* 2005;94:397-408.
- Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661-672
- Kovacs WJ, Olsen NJ. Androgen receptors in human thymocytes. *J Immunol* 1987;139:490-493.
- Kubera M, Skowron-Cendrzak A, Mazur-Kolecka B, Bubak-Satora M, Basta-Kaim A, Laskowska-Bożek H, Ryżewski J. Stress-induced changes in muscarinic and β -adrenergic binding sites on rat thymocytes and lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1992;37:229-235.
- Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Nakura H, Kobayashi S. Influence of androgen on tyrosine hydroxylase mRNA in adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995;26:208-212.
- Kumar N, Shan LX, Hardy MP, Bardin CW, Sundaram K. Mechanism of androgen-induced thymolysis in rats. *Endocrinology* 1995;136:4887-4893
- Kumer SC, Vrana KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 1996;67:443-462.
- Kurz B, Feindt J, von Gaudecker B, Kranz A, Loppnow H, Mentlein R. β -adrenoceptor-mediated effects in rat cultured thymic epithelial cells. *Br J Pharmacol* 1997;120:1401-1408.
- Kyewski B, Klein LA. Central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 2006;24:571-606.
- Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey EA. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* 2006;4:338-343.

- Law DA, Spruyt LL, Paterson DJ, Williams AF. Subsets of thymopoietic rat thymocytes defined by the expression of the CD2 antigen and the MRC OX-22 determinant of the leukocyte-common antigen CD45. *Eur J Immunol* 1989;19:2289-2295.
- Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin EM. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2005;4:351-363.
- Lecoeur H, Ledru E, Prevost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods* 1997;209:111-123.
- Le Douarin NM, Jotereau FV. Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J Exp Med* 1975;142:17-40.
- Lee DK, Hakim FT, Gress RE. The thymus and the immune system: layered levels of control. *J Thorac Oncol* 2010;5:273-276.
- Lenartowski R, Goc A. Epigenetic, transcriptional and posttranscriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene. *Int J Dev Neurosci* 2011;29:873-883.
- Leposavić G, Perišić M. Age-associated remodeling of thymopoiesis: role for gonadal hormones and catecholamines. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:290-322.
- Leposavić G, Mičić M, Ugrešić N, Bogojević M, Isaković K. Components of sympathetic innervation of the rat thymus during late fetal and postnatal development: histofluorescence and biochemical study. *Thymus* 1992;19:77-87.
- Leposavić G, Karapetrović B, Obradović S, Vidić-Danković B, Kosec D. Differential effects of gonadectomy on the thymocyte phenotypic profile in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:269-276
- Leposavić G, Ugrešić N, Pejčić-Karapetrović B, Mičić M. Castration of sexually immature rats affects sympathetic innervation of the adult thymus. *Neuroimmunomodulation* 2000a;7:59-67.
- Leposavić G, Plećaš B, Kosec D. Differential effects of chronic propranolol treatment on the phenotypic profile of thymocytes from immature and adult rats. *Immunopharmacology* 2000b;46:79-87.
- Leposavić G, Pejčić-Karapetrović B, Kosec D. Alterations in thymopoiesis in intact and peripubertally orchidectomized adult rats of different age. *Mech Ageing Dev* 2002;123:401-411.

- Leposavić G, Arsenović-Ranin N, Radojević K, Kosec D, Pešić V, Vidić-Danković B, Plečas-Solarović B, Pilipović I. 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* 2006;285:87-99.
- Leposavić G, Radojević K, Vidić-Danković B, Kosec D, Pilipović I, Perišić M. Early postnatal castration affects thymic and thymocyte noradrenaline levels and beta-adrenoceptor-mediated influence on the thymopoiesis in adult rats. *J Neuroimmunol* 2007;182:100-115.
- Leposavić G, Pilipović I, Radojević K. 2008a. Immunoregulatory role of noreadrenergic neural and non-neural system: role for β -adrenoceptor – mediated mechanisms in regulation of T-lymphocyte development. In: *Beta Blockers: New Research*, Endo, M, Matsumoto, N, Eds. Nova Science Publishers.
- Leposavić G, Pilipović I, Radojević K, Pešić V, Perišić M, Kosec D. Catecholamines as immunomodulators: a role for adrenoceptor-mediated mechanisms in fine tuning of T-cell development. *Auton Neurosci* 2008b;144:1-12.
- Leposavić G, Pilipović I, Perišić M. Cellular and nerve fibre catecholaminergic thymic network: steroid hormone dependent activity. *Physiol Res* 2011;60 (Suppl. 1):S71-S82.
- Lewis EJ, Harrington CA, Chikaraishi DM. Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by glucocorticoid and cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3550-3554.
- Li J, Iwanami N, Hoa VQ, Furutani-Seiki M, Takahama Y. Noninvasive intravital imaging of thymocyte dynamics in medaka. *J Immunol* 2007;179:1605-1615.
- Li J, Park J, Foss D, Goldschneider I. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J Exp Med* 2009;206:607-622.
- Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006;25:455-471.
- Lio CW, Hsieh CS. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 2008;28:100-111.

- Loveland BE, Jarrott B, McKenzie IFC. The detection of β -adrenoceptors on murine lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 1981;3:45-55.
- Lucas B, Vasseur F, Penit C. Production, selection, and maturation of thymocytes with high surface density of TCR. *J Immunol* 1994;153:53-62.
- Luine V N, Khylichevskaya RI, McEwen BS. Effect of gonadal steroids on activities of monoamine oxidase and choline acetylase in rat brain. *Brain Res* 1975;86:293-306.
- Madden KS. Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. *Brain Behav Immun* 2003;17:5-10.
- Madden KS, Felten DL. β -adrenoceptor blockade alters thymocyte differentiation in aged mice. *Cell Mol Biol* 2001;47:189-196.
- Madden KS, Sanders VM, Felten DL. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:417-448.
- Madden KS, Bellinger DL, Felten SY, Snyder E, Maida ME, Felten DL. Alterations in sympathetic innervation of thymus and spleen in aged mice. *Mech Ageing Dev* 1997; 94:165-175
- Madsen C, Claesson MH, Ropke C. Immunotoxicity of the pyrethroid insecticides deltamethrin and α -cypermethrin. *Toxicology* 1996;107:219-227.
- MacDonald R. NK1.1 + T Cell Receptor- α /E + Cells: New Their Origin, Specificity, and Function. *J Exp Med* 1995;182:633-638.
- Maestroni GJ, Conti A. Modulation of hematopoiesis via alpha 1-adrenergic receptors on bone marrow cells. *Exp Hematol* 1994a;22:313-320.
- Maestroni GJ. Conti A. Noradrenergic modulation of lymphohematopoiesis. *Int J Immunopharmacol* 1994b;16:117-122.
- Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 2005;4:579-586.
- Maisel AS, Michel MC. Beta-adrenoceptor control of immune function in congestive heart failure. *Br J Clin Pharmacol* 1990;30:49-53.
- Marchetti B, Morale MC, Pelletier G. The thymus gland as a major target for the central nervous system and the neuroendocrine system: neuroendocrine modulation of

- thymic β_2 -adrenergic receptor distribution as revealed by in vitro autoradiography. *Mol Cell Neurosci* 1990a;1:10-19.
- Marchetti B, Morale MC, Pelletier G. 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. *Prog Neuroendocrinimmunol* 1990b;3:103-115.
- Marchetti B, Morale MC, Paradis P, Bouvier M. Characterization, expression, and hormonal control of a thymic beta 2-adrenergic receptor. *Am J Physiol* 1994;267:718-731.
- Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 2006;25:441-454.
- Marino F, Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Hematol* 1999;27:489-495.
- Marrack P, Kappler J. The T cell receptor. *Science* 1987;238:1073-1079.
- Matsuda JL, Gapin L, Sidobre S, Kieper WC, Tan JT, Ceredig R, Surh CD, Kronenberg M. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol* 2002;3:966-974.
- Mayack SR, Berg LJ. Cutting edge: an alternative pathway of CD4+ T cell differentiation is induced following activation in the absence of gamma-chain-dependent cytokine signals. *J Immunol* 2006;176:2059-2063.
- Martin CH, Aifantis I, Scimone ML, von Andrian UH, Reizis B, von Boehmer H, Gounari F. Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat Immunol* 2003;4:866-873.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004;427:355-360.
- Matsuda JL, Zhang Q, Ndonge R, Richardson SK, Howell AR, Gapin L. T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the development of Valpha14i NKT cells. *Blood* 2006;107:2797-2805.
- Matsumoto K, Yoshikai Y, Moroi Y, Asano T, Ando T, Nomoto K. Two differential

- pathways from double-negative to double-positive thymocytes. *Immunology* 1991;72:20-26.
- Matsuura A, Kinebuchi M, Chen HZ, Katabami S, Shimizu T, Hashimoto Y, Kikuchi K, Sato N. NKT cells in the rat: organ-specific distribution of NK T cells expressing distinct V alpha 14 chains. *J Immunol* 2000;164:3140-3148.
- McCaughy TM, Wilken MS, Hogquist KA. Thymic emigration revisited. *J Exp Med* 2007;204:2513-2520.
- McCaughy TM, Baldwin TA, Wilken MS, Hogquist KA. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med* 2008;205:2575-2584.
- Meier CA. Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors. *J Receptor Signal Transduction Res* 1997;17:319-335.
- Meinkoth JL, Alberts AS, Went W, Fantozzi D, Taylor SS, Hagiwara M, Montminy M, Feramisco JR. Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem* 1993;127-128:179-186.
- Melia KR, Rasmussen K, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ, Duman RS. Coordinate regulation of the cyclic AMP system with firing rate and expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus: effects of chronic stress and drug treatments. *J Neurochem* 1992;58:494-502.
- Melvin JE, Hamill RW. Gonadal hormone regulation of neurotransmitter synthesizing enzymes in the developing hypogastric ganglion. *Brain Res* 1986;383:38-46.
- Melvin JE, Hamill RW. The major pelvic ganglion: androgen control of postnatal development. *J Neurosci* 1987;7:1607-1612.
- Melvin JE, Hamill RW. Androgen-specific critical periods for the organization of the major pelvic ganglion. *J Neurosci* 1989;9:736-742.
- Melvin JE, McNeill TH, Hamill RW. Biochemical and morphological effects of castration on the postorganizational development of the hypogastric ganglion. *Dev Brain Res* 1988;38:131-139.
- Mentlein R, Kendall MD. The brain and the thymus have much in common: a functional analysis of their microenvironments. *Immunol Today* 2000;21:133-140.
- Metzger TC, Anderson MS. Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunol Rev* 2011;241:89-103.

- Mićić M, Leposavić G, Ugrešić N. Relationships between monoaminergic and cholinergic innervation of the rat thymus during aging. *J Neuroimmunol* 1994;49:205-212.
- Mignini F, Streccioni V, Amenta F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003;23:1-25.
- Milićević NM, Milićević Z, Mujović S. Histochemical characterization of the lipid content in the macrophages of the cortico-medullary zone of the rat thymus. *Anat Histol Embryol* 1986;15:355-360.
- Miller JF. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol Rev* 2002;185:7-14.
- Mills PJ, Yu H, Ziegler MG, Patterson T, Grant I. Vulnerable caregivers of patients with Alzheimer's disease have a deficit in circulating CD62L-T lymphocytes. *Psychosom Med* 1999;61:168-174.
- Minagawa M, Oya H, Yamamoto S, Shimizu T, Bannai M, Kawamura H, Hatakeyama K, Abo T. Intensive expansion of natural killer T cells in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice and its association with sympathetic nerve activation. *Hepatology* 2000;31:907-915.
- Miosge L, Zamoyska R. Signalling in T-cell development: is it all location, location, location? *Curr Opin Immunol* 2007;19:194-199.
- Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT, Förster R. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med* 2004;200:481-491.
- Mitnacht R, Bischof A, Torres-Nagel N, Hünig T. Opposite CD4/CD8 lineage decisions of CD4+8+ mouse and rat thymocytes to equivalent triggering signals: correlation with thymic expression of a truncated CD8 alpha chain in mice but not rats. *J Immunol* 1998;160:700-707.
- Miyazaki T, Lemonnier FA. Modulation of thymic selection by expression of an immediate-early gene, early growth response 1 (Egr-1). *J Exp Med* 1998;188:715-723.
- Modigliani Y, Thomas-Vaslin V, Bandeira A, Coltey M, Le Douarin NM, Coutinho A, Salaün J. Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate

- dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7555-7559.
- Monjo M, Rodriguez AM, Palou A, Roca P. Direct effects of testosterone, 17 β -estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis. *Endocrinology* 2003;144:4923-4930.
- Moran AE, Hogquist KA. T-cell receptor affinity in thymic development. *Immunology* 2012;135:261-267.
- Morris AJ, Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 1999;79:1373-1430.
- Müller S, Weihe E. Interrelation of peptidergic innervation with mast cells and ED1-positive cells in rat thymus. *Brain Behav Immun* 1991;5:55-72.
- Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K. Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 2007;316:1349-1353.
- Musso NR, Brenci S, Setti M, Indiveri F, Lotti G. Catecholamine content and in vitro catecholamine synthesis in peripheral human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3553-3557.
- Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito FN. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 1997;17:393-398.
- Nagaoka H, Yu W, Nussenzweig MC. Regulation of RAG expression in developing lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2000;12:187-190.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
- Naito T, Tanaka H, Naoe Y, Taniuchi I. Transcriptional control of T-cell development. *Int Immunol* 2011;23:661-668.
- Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C, Rudensky AY. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 1998;280:450-453.
- Nakano K, Higashi T, Takagi R, Hashimoto K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol* 2009;21:645-654.

- Nance DM, Hopkins DA, Bieger D. Re-investigation of the innervation of the thymus gland in mice and rats. *Brain Behav Immun* 1987;1:134-147.
- Neil-Dwyer G, Bartlett J, McAinsh J, Cruickshank JM. β -Adrenoceptor blockers and the blood-brain barrier. *Br J Clin Pharmacol* 1981;11:549-553.
- Nitta T, Murata S, Sasaki K, Fujii H, Ripen AM, Ishimaru N, Koyasu S, Tanaka K, Takahama Y. Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity* 2010;32:29-40.
- Novotny GEK, Sommerfeld H, Zirbes T. Thymic innervation in the rat: a light and electron microscopical study. *J Comp Neurol* 1990;302:552-561.
- Oberbeck R, Schürmeyer T, Jacobs R, Benschop RJ, Sommer B, Schmidt RE, Schedlowski M. Effects of beta-adrenoceptor-blockade on stress-induced adrenocorticotrophin release in humans. *Neuroendocrinology* 1999;69:309-315.
- Odaka C, Mizuochi T. Macrophages are involved in DNA degradation of apoptotic cells in murine thymus after administration of hydrocortisone. *Cell Death Differ* 2002;9:104-112.
- Okamoto Y, Douek DC, McFarland RD, Koup RA. Effects of exogenous interleukin-7 on human thymus function. *Blood* 2002;99:2851-2858.
- Olsen NJ, Kovacs WJ. Increased thymic size and thymocyte interleukin 2 production in androgen-resistant mice. *Scand J Immunol* 1989;29:733-738.
- Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 1996;17:369-384.
- Olsen NJ, Kovacs WJ. Evidence That Androgens Modulate Human Thymic T Cell Output. *J Investig Med* 2011;59:32-35.
- Olsen NJ, Watson MB, Henderson GS, Kovacs WJ. Androgen deprivation induces phenotypic and functional changes in the thymus of adult male mice. *Endocrinology* 1991a;129:2471-2476.
- Olsen NJ, Watson MB, Kovacs WJ. Studies of immunological function in mice with defective androgen action. Distinction between alterations in immune function due to hormonal insensitivity and alterations due to other genetic factors. *Immunology* 1991b; 73:52-57
- Olsen NJ, Viselli SM, Shults K, Stelzer G, Kovacs WJ. Induction of immature thymocyte proliferation after castration of normal male mice. *Endocrinology* 1994;134:107-113

- Olsen NJ, Viselli SM, Fan J, Kovacs VJ. Androgens accelerate thymocyte apoptosis. *Endocrinology* 1998;139:748-752.
- Olsen NJ, Olson G, Viselli SM, Gu X, Kovacs WJ. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology* 2001;142:1278-1283
- Oltz EM. Regulation of antigen receptor gene assembly in lymphocytes. *Immunol Res* 2001;23:121-133.
- Oner H, Ozan E. Effects of gonadal hormones on thymus gland after bilateral ovariectomy and orchidectomy in rats. *Arch Androl* 2002;48:115-126.
- Ou XM, Chen K, Shih JC. Glucocorticoid and Androgen Activation of Monoamine Oxidase A Is Regulated Differently by R1 and Sp1. *J Biol Chem* 2006;281:21512-21525.
- Oukka M, Ho IC, de la Brousse FC, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* 1998;9:295-304.
- Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003;24:444-448.
- Palmer E. Negative selection-clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2003;3:383-391.
- Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L, Self C, Sinigaglia F. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest* 1997;100:1513-1519.
- Park JH, Adoro S, Guintert T, Erman B, Alag AS, Catalfamo M, Kimura MY, Cui Y, Lucas PJ, Gress RE, Kubo M, Hennighausen L, Feigenbaum L, Singer A. Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat Immunol* 2010;11:257-264.
- Partanen M, Hervonen A. The effects of long-term castration on the histochemical demonstrable catecholamines in the hypogastric ganglion of the rat. *J Auton Nerv Syst* 1979;1:139-147.
- Pawelec G, Remarque E, Barnett Y, Solana R. T cells and aging. *Frontier Biosci* 1998;3:59-99.

- Pazirandeh A, Jondal M, Okret S. Conditional expression of a glucocorticoid receptor transgene in thymocytes reveals a role for thymic- derived glucocorticoids in thymopoiesis in vivo. *Endocrinology* 2005;146:2501-2507.
- Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol Pathol* 2006;34:504-514.
- Pellicci DG, Hammond KJ, Uldrich AP, Baxter AG, Smyth MJ, Godfrey DI. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1– CD4+ CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* 2002;195:835–844.
- Pellicci DG, Uldrich AP, Kyparissoudis K, Crowe NY, Brooks AG, Hammond KJ, Sidobre S, Kronenberg M, Smyth MJ, Godfrey DI. Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* 2003;33:1816-1823.
- Penit C, Vasseur F. Expansion of mature thymocyte subsets before emigration to the periphery. *J Immunol* 1997;159:4848-4856.
- Penit C, Lucas B, Vasseur F. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J Immunol* 1995;154:5103-5113.
- Petrovic SL, Engel G, Haugland RP, Dowben RM Characterization of beta-adrenergic receptor subtypes in androgen-induced mouse kidney hypertrophy using a new high-affinity ligand, [125I]iodocyanopindolol. *Biochim Biophys Acta* 1983;756:286-296.
- Pilipović I, Vidić-Danković B, Perišić M, Radojević K, Čolić M, Todorović V, Laposavić G. Sexual dimorphism in the catecholamine-containing thymus microenvironment: a role for gonadal hormones. *J Neuroimmunol* 2008;195:7-20.
- Plečaš-Solarović B, Lalić Lj, Laposavić G. Age-dependent morphometrical changes in the thymus of male propranolol-treated rats. *Ann Anat* 2004;186:141-147.
- Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 2003;171:4521-4527.
- Prichard BNC, Tomlinson B, Walden RJ, Bhattaderrjce P. The β -adrenergic blockade withdrawal phenomenon. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983;5:556-562.

- Prockop SE, Petrie HT. Regulation of thymus size by competition for stromal niches among early T cell progenitors. *J Immunol* 2004;173:1604-1611.
- Poznansky MC, Olszak IT, Evans RH, Wang Z, Foxall RB, Olson DP, Weibrecht K, Luster AD, Scadden DT. Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest* 2002;109:1101–1110.
- Punt JA, Osborne BA, Takahama Y, Sharrow SO, Singer A. Negative selection of CD4+CD8+ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J Exp Med* 1994;179:709-713.
- Qayyum MA, Fatani JA. Use of glyoxylic acid in the demonstration of autonomic nerve profiles. *Experientia* 1985;41:1389-1390.
- Qiu YH, Peng YP, Jiang JM, Wang JJ. Expression of tyrosine hydroxylase in lymphocytes and effect of endogenous catecholamines on lymphocyte function. *Neuroimmunomodulation* 2004;11:75-83.
- Qiu YH, Cheng C, Dai L, Peng YP. Effect of endogenous catecholamines on lymphocyte function. *J Neuroimmunol* 2005;167:45-52.
- Quong MW, Romanow WJ, Murre C. E protein function in lymphocyte development. *Annu Rev Immunol* 2002;20:301-322.
- Rabinovitch PS, Torres RM, Engel D. Simultaneous cell cycle analysis and two-color surface immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single laser excitation: applications to study of cell activation and the cell cycle of murine Ly-1 B cells. *J Immunol* 1986;136:2769-2775.
- Radojević K, Kosec D, Perišić M, Pilipović I, Vidić-Danković B, Laposavić G. Neonatal androgenization affects the efficiency of β -adrenoceptor-mediated modulation of thymopoiesis. *J Neuroimmunol* 2011;239:68-79.
- Ramsdell F, Lantz T, Fowlkes BJ. A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* 1989;246:1038-1041.
- Ramsdell F, Jenkins M, Dinh Q, Fowlkes BJ. The majority of CD4+8– thymocytes are functionally immature. *J Immunol* 1991;147:1779-1785.

- Rao PR, Reddy MN, Ramakrishna S, Diwan PV. Comparative in vivo evaluation of propranolol hydrochloride after oral and transdermal administration in rabbits. *Eur J Pharm Biopharm* 2003;56:81-85.
- Rauški A, Kosec D, Vidić-Danković B, Plećaš-Solarović B, Laposavić G. Effects of beta-adrenoceptor blockade on the phenotypic characteristics of thymocytes and peripheral blood lymphocytes. *Int J Neurosci* 2003a;113:1653-1673.
- Rauški A, Kosec D, Vidić-Danković B, Radojević K, Plećaš-Solarović B, Laposavić G. Thymopoiesis following chronic blockade of β -adrenoceptors. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2003b;25:513-528.
- Ray DE, Cramer JE. The action of decamethrin (a synthetic pyrethroid) on the rat. *Pest Biochem Physiol* 1979;10:333-340.
- Reichert RA, Weissman IL, Butcher EC. Phenotypic analysis of thymocytes that express homing receptors for peripheral lymph nodes. *J Immunol* 1986;136:3521-3528.
- Rezzani R, Bonomini F, Fabrizio LR. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Prog Histochem Cytochem* 2008;43:73-120.
- Rife SU, Marquez MG, Escalante A, Velich T. The effect of testosterone on the immune response. 1. Mechanism of action on antibody-forming cells. *Immunol Invest* 1990;19:259-270.
- Roden AC, Moser MT, Tri SD, Mercader M, Kuntz SM, Dong H, Hurwitz AA, McKean DJ, Celis E, Leibovich BC, Allison JP, Kwon ED. Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *J Immunol* 2004;173:6098-6108.
- Rogausch H, del Rey A, Oertel J, Besedovsky HO. Norepinephrine stimulates lymphoid cell mobilization from the perfused rat spleen via β -adrenergic receptors *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1999;276:724-730.
- Roubinian JR, Papoian R, Talal N. Androgenic hormones modulate autoantibody responses and improve survival in murine lupus. *J Clin Invest* 1977a;59:1066-1070

- Roubinian JR, Papoian R, Talal N. Effects of neonatal thymectomy and splenectomy on survival and regulation of autoantibody formation in NZB/NZW F1 mice. *J Immunol* 1977b;118:1524-1529.
- Sabapathy K, Kallunki T, David JP, Graef I, Karin M, Wagner EF. c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have similar and stage-dependent roles in regulating T cell apoptosis and proliferation. *J Exp Med* 2001;193:317-328.
- Saint-Ruf C, Panigada M, Azogui O, Debey P, von Boehmer H, Grassi F. Different initiation of pre-TCR and gammadeltaTCR signalling. *Nature* 2000;406:524-527.
- Sakabe K, Kawashima I, Urano R, Seiki K, Itoh T. Effects of sex steroids on the proliferation of thymic epithelial cells in a culture model: a role of protein kinase C. *Immunol Cell Biol* 1994;72:193-199.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182:18-32.
- Sandberg G, Fredholm BB. Regulation of thymocyte proliferation: effects of L-alanine, adenosine and cyclic AMP in vitro. *Thymus* 1981;3:63-75.
- Sanders VM, Straub RH. Norepinephrine, the β -adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun* 2002;16:290-333.
- Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS, Kasprovicz DJ, Fuchs BA, Street NE. Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. *J Immunol* 1997;158:4200-4210.
- Santoni G, Cantalamessa F, Cavagna R, Romagnoli S, Spreghini, Piccoli M. Cypermethrin-induced alteration of thymocyte distribution and functions in perinatally-exposed rats. *Toxicology* 1998;125:67-68.
- Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev* 2000;21:412-443.
- Shima S. Effects of androgen on α - and β - adrenergic receptors in membranes from the rat seminal vesicle. *Biochim Biophys Acta* 1992;1175:123-127.

- Schümann J, Pittoni P, Tonti E, Macdonald HR, Dellabona P, Casorati G. Targeted expression of human CD1d in transgenic mice reveals independent roles for thymocytes and thymic APCs in positive and negative selection of Valpha14i NKT cells. *J Immunol* 2005;175:7303-7310.
- Schwarz BA, Bhandoola A. Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat Immunol* 2004;5:953-960.
- Schwarz BA, Sambandam A, Maillard I, Harman BC, Love PE, Bhandoola A. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol* 2007;178:2008-2017.
- Scollay R, Godfrey DI. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol Today* 1995;16:268-273
- Screpanti I, Scarpa S, Meco D, Bellavia D, Stuppia L, Frati L, Modesti A, Gulino A. Epidermal growth factor promotes a neural phenotype in thymic epithelial cells and enhances neuropoietic cytokine expression. *J. Cell Biol* 1995;130:183-192.
- Sebzda E, Wallace VA, Mayer J, Yeung RS, Mak TW, Ohashi PS. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 1994;263:1615-1618.
- Selmanoff M, Shu C, Hartman RD, Barraclough CA, Petersen SL. Tyrosine hydroxylase and POMC mRNA in the arcuate region are increased by castration and hyperprolactinemia. *Brain Res Mol Brain Res* 1991;10:277-281.
- Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991;67:879-888.
- Seong RH, Chamberlain JW, Parnes JR. Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail. *Nature* 1992;356:718-720.
- Shima S. Effects of androgen on alpha- and beta-adrenergic receptors in membranes from the rat seminal vesicle. *Biochim Biophys Acta* 1992;1175:123-127.
- Shortman K, Vremec D, Egerton M. 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* 1991;173:323-332.

- Siiteri PK, Jones LA, Roubinian JR, Talal N. Sex steroids and the immune system: I. Sex differences in autoimmune disease in NZBrNZW hybrid mice. *J Steroid Biochem* 1980;12:425-432.
- Simons DM, Picca CC, Oh S, Perng OA, Aitken M, Erikson J, Caton AJ. How specificity for self-peptides shapes the development and function of regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2010;88:1099-1107.
- Singer A. New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision. *Curr Opin Immunol* 2002;14:207-15.
- Singer A, Adoro S, Park JH. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* 2008;8:788-801.
- Singh U. Effect of catecholamines on lymphopoiesis in fetal mouse thymic explants. *J Anat* 1979;129:279-292.
- Singh U. Sympathetic innervation of fetal mouse thymus. *Eur J Immunol* 1984;14:757-759.
- Singh U. Effect of sympathectomy on the maturation of fetal thymocytes grown within the anterior eye chambers in mice. *Adv Exp Biol Med* 1985a;186:349-356.
- Singh U. Lymphopoiesis in the nude fetal thymus following sympathectomy. *Cell Immunol* 1985b;93:222-228.
- Singh U, Owen JJ. Studies on the maturation of thymus stem cell. The effects of catecholamines, histamine and peptide hormones on the expression of T cell alloantigen. *Eur J Immunol* 1976;6:59-62.
- Singh U, Millison DS, Smith PA, Owen JJT. Identification of beta-adrenoceptors during thymocyte ontogeny in mice. *Eur. J. Immunol* 1979;9:31-35.
- Smith HJ: The need to redefine membrane stabilizing activity of β -adrenergic receptor antagonists. *J Mol Cell Cardiol* 1982;14:495-500.
- Sommandas V, Rutledge EA, Van Yserloo B, Fuller J, Lernmark A, Drexhage HA. Low-density cells isolated from the rat thymus resemble branched cortical macrophages and have a reduced capability of rescuing double-positive thymocytes from apoptosis in the BB-DP rat. *J Leukoc Biol* 2007;82:869-876.

- Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990;145:1430-1434.
- Spengler RN, Chensue SW, Giacherio DA, Blenk N, Kunkel SL. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *J Immunol* 1994;152:3024-3031.
- Staehelin M, Muller P, Portenier M, Harris AW. Beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase activity in murine lymphoid cell lines. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 1985;10:55-64.
- Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:139-176.
- Stephens GL, Ignatowicz L. Decreasing the threshold for thymocyte activation biases CD4CT cells toward a regulatory (CD4+CD25+) lineage. *Eur J Immunol* 2003;33:1282-1291.
- Stephens LA, Mason D. CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J Immunol* 2000;165:3105-3110.
- Stiles GL, Caron GL, Lefkowitz RJ. Beta-adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. *Physiol Rev* 1984;64:661-743.
- Strack AM, Sawyer WB, Platt KB, Loewy AD. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. *Brain Res* 1989;491:274-296.
- Straub RH, Rauch L, Rauh L, Pongratz G. Sympathetic inhibition of IL-6, IFN- γ , and KC/CXCL1 and sympathetic stimulation of TGF- β in spleen of early arthritic mice. *Brain Behav Immun* 2011;25:1708-1715.
- Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG, Manley NR. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol* 2003;4:1128-1135.
- Suda T, Murray R, Guidos C, Zlotnik A. Growth-promoting activity of IL-1 alpha, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in combination with IL-2, IL-4, or IL-7 on murine thymocytes. Differential effects on CD4/CD8 subsets and on CD3+/CD3- double-negative thymocytes. *J Immunol* 1990;144:3039-3045.

- Sugawara T, Moriguchi T, Nishida E, Takahama Y. Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* 1998;9:565-574.
- Sulser F, Manier DH, Janowsky AJ, Okada F. Regulation of noradrenergic receptor systems in brain that are coupled to adenylate cyclase. *J Neural Transm Suppl* 1983;18:121-130.
- Sun J, Fu L, Tang X, Han Y, Ma D, Cao J, Kang N, Ji H. Testosterone modulation of cardiac β -adrenergic signals in a rat model of heart failure. *Gen Comp Endocrinol* 2011;172:518-525.
- Sun Z, Unutmaz D, Zou YR, Sunshine MJ, Pierani A, Brenner-Morton S, Mebius RE, Littman DR. Requirement for ROR γ in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 2000;288:2369-2373.
- Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994;372:100-103.
- Sutherland JS, Spyroglou L, Muirhead JL, Heng TS, Prieto-Hinojosa A, Prince HM, Chidgey AP, Schwarzer AP, Boyd RL. Enhanced immune system regeneration in humans following allogeneic or autologous hemopoietic stem cell transplantation by temporary sex steroid blockade. *Clin Cancer Res* 2008;14:1138-1149.
- Suzuki Y, Ishii H, Furuya H, Arai Y. Developmental changes of the hypogastric ganglion associated with the differentiation of the reproductive tracts in the mouse. *Neurosci Lett* 1982;32:271-276.
- Sved AF, Cano G, Card JP. Neuroanatomical specificity of the circuits controlling sympathetic outflow to different targets. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol* 2001;28:115-119.
- Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 2006;6:127-135.
- Takahama Y, Nitta T, Mat Ripen A, Nitta S, Murata S, Tanaka K. Role of thymic cortex-specific self-peptides in positive selection of T cells. *Semin Immunol* 2010;22:287-293.

- Takai Y, Wong GG, Clark SC, Burakoff SJ, Herrmann SH. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1988;140:508-512.
- Tan KS, Nackley AG, Satterfield K, Maixner W, Diatchenko L, Flood PM. β_2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF- κ B-independent mechanisms. *Cell Signal* 2007;19:251-260.
- Tang S, Moore ML, Grayson JM, Dubey P. Increased CD8⁺ T cell function following castration and immunization is countered by parallel expansion of regulatory T cells. *Cancer Res* 2012;72:1975-1985.
- Tank AW, Curella P, Ham L. Induction of mRNA for tyrosine hydroxylase by cyclic AMP and glucocorticoids in a rat pheochromocytoma cell line: evidence for the regulation of tyrosine hydroxylase synthesis by multiple mechanisms in cells exposed to elevated levels of both inducing agents. *Mol Pharmacol* 1986;30:497-503.
- Tanriverdi F, Silveira LF, MacColl GS, Bouloux PM. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol* 2003;176:293-304.
- Taub DD, Longo DL. Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev* 2005;205:72-93.
- Terabe M, Berzofsky JA. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* 2008;101:277-348.
- Tilloy F, Di Santo JP, Bendelac A, Lantz O. Thymic dependence of invariant V α 14⁺ natural killer-T cell development. *Eur J Immunol* 1999;29:3313-3318.
- Tomita Y, Patterson R, Suszko IM. Respiratory mast cells and basophiloid cells. II. Effect of pharmacologic agents on 3'5'-adenosine monophosphate content and on antigen-induced histamine release. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1974;47:261-272.
- Torres-Nagel N, Kraus E, Brown MH, Tiefenthaler G, Mitnacht R, Williams AF, Hunig T. Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur J Immunol* 1992;22:2841-2848.

- Toussaint-Demyelle D, Scheiff JM, Haumont S. Thymic nurse cells: morphological study during their isolation from murine thymus. *Cell Tissue Res* 1990;261:115-123.
- Trotter RN, Stornetta RL, Guyenet PG, Roberts MR. Transneuronal mapping of the CNS network controlling sympathetic outflow to the rat thymus. *Auton Neurosci* 2007;131:9-20.
- Tsao CW, Cheng JT, Shen CL, Lin YS. 6-Hydroxydopamine induces thymocyte apoptosis in mice. *J Neuroimmunol* 1996;65:91-95.
- Tsuchida M, Konishi M, Jojima K, Naito K, Fujikura Y, Fukumoto T. Analysis of cell surface antigens on glucocorticoid-treated rat thymocytes with monoclonal antibodies. *Immunol Lett* 1994;39:209-217.
- Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Boyd RL, Takahama Y. CCR7 signals are essential for cortex-to-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* 2004;200:493-505.
- Uldrich AP, Patel O, Cameron G, Pellicci DG, Day EB, Sullivan LC, Kyparissoudis K, Kjer-Nielsen L, Vivian JP, Cao B, Brooks AG, Williams SJ, Illarionov P, Besra GS, Turner SJ, Porcelli SA, McCluskey J, Smyth MJ, Rossjohn J, Godfrey DI. A semi-invariant V α 10⁺ T cell antigen receptor defines a population of natural killer T cells with distinct glycolipid antigen-recognition properties. *Nat Immunol* 2011;12:616-623.
- Ushiki T. A scanning electron-microscopic study of the rat thymus with special reference to cell types and migration of lymphocytes into the general circulation. *Cell Tissue Res* 1986;244:285-298.
- van de Wijngaert FP, Kendall MD, Schuurman HJ, Rademakers LH, Kater L. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1984;237:227-237.
- van Meerwijk JP, Bianchi T, Marguerat S, MacDonald HR. Thymic lineage commitment rather than selection causes genetic variations in size of CD4 and CD8 compartments. *J Immunol* 1998;160:3649-3654.
- van Tits LJ, Michel MC, Grosse-Wilde H, Happel M, Eigler FW, Soliman A, Brodde OE. Catecholamines increase lymphocyte beta 2-adrenergic receptors via a beta

- 2-adrenergic, spleen-dependent process. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1990;258:191-202
- Vang KB, Yang J, Mahmud SA, Burchill MA, Vegoe AL, Farrar MA. IL-2-7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development. *J Immunol* 2008;181:3285-3290.
- Vasilijić S, Čolić M, Vučević D. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor is an anti-apoptotic cytokine for thymic dendritic cells and a significant modulator of their accessory function. *Immunol Lett* 2003;86:99-112.
- Vicente R, Swainson L, Marty-Grès S, De Barros SC, Kinet S, Zimmermann VS, Taylor N. Molecular and cellular basis of T cell lineage commitment. *Semin Immunol* 2010;22:270-275.
- Viselli SM, Olsen NJ, Shults K, Steizer G, Kovacs WJ. Immunochemical and flow cytometric analysis of androgen receptor expression in thymocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1995a;109:19-26.
- Viselli SM, Stanziale S, Shults K, Kovacs WJ, Olsen NJ. Castration alters peripheral immune function in normal male mice. *Immunology* 1995b;84:337-342
- Vizi ES. Physiological role of cytoplasmic and nonsynaptic release of transmitter. *Neurochem Int* 1984;6:435-440.
- Vizi ES. Role of high-affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the CNS. *Pharmacol Rev* 2000;52:63-89.
- Vizi ES, Labos E. Nonsynaptic interactions at presynaptic level. *Prog Neurobiol* 1991;37:145-163.
- Vizi ES, Orso E, Osipenko ON, Hasko G, Elenkov IJ. Neurochemical, electrophysiological and immunocytochemical evidence for a noradrenergic link between the sympathetic nervous system and thymocytes. *Neuroscience* 1995;68:1263-1276.
- Voisine C, Hubert FX, Trinité B, Heslan M, Josien R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002;169:2284-2291.
- von Boehmer H, Aifantis I, Feinberg J, Lechner O, Saint-Ruf C, Walter U, Buer J, Azogui O. Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr Opin Immunol* 1999;11:135-142.

- von Freeden-Jeffrey U, Solvason N, Howard M, Murray R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 1997;7:147-154.
- von Patay B, Loppnow H, Feindt J, Kurz B, Mentlein R. Catecholamines and lipopolysaccharide synergistically induce the release of interleukin-6 from thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol* 1998;86:182-189.
- von Patay B, Kurz B, Mentlein R. Effect of transmitters and co-transmitters of the sympathetic nervous system on interleukin-6 synthesis in thymic epithelial cells. *Neuroimmunomodulation* 1999;6:45-50.
- Vrisekoop N, den Braber I, de Boer AB, Ruiters AF, Ackermans MT, van der Crabben SN, Schrijver EH, Spierenburg G, Sauerwein HP, Hazenberg MD, de Boer RJ, Miedema F, Borghans JA, Tesselaar K. Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:6115-6120.
- Wajeman-Chao SA, Lancaster SA, Graf LH, Chambers D. Mechanism of catecholamine-mediated destabilization of messenger RNA encoding Thy-1 protein in T-lineage cells. *J Immunol* 1998;161:4825-4833.
- Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005;436:1181-1185.
- Watkins TW, Keast JR. Androgen-sensitive preganglionic neurons innervate the male rat pelvic ganglion. *Neuroscience* 1999;93:1147-1157.
- Wei DG, Lee H, Park SH, Beaudoin L, Teyton L, Lehuen A, Bendelac A. Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J Exp Med* 2005;202:239-248.
- Wekerle H, Ketelsen UP, Ernst M. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization. *J Exp Med* 1980;151:925-944.
- Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain* 1996;6:275-288.

- Werlen G, Hausmann B, Naehre DE. Signaling life and death in thymus: timing is everything. *Science* 2003;299:1859-1863.
- Wernli G, Hasan W, Bhattacharjee A, van Rooijen N, Smith PG. Macrophage depletion suppresses sympathetic hyperinnervation following myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2009;104:681-693.
- Whyte K, Jones CR, Howie CA, Deighton N, Sumner DJ, Reid JL. Haemodynamic, metabolic, and lymphocyte beta₂-adrenoceptor changes following chronic beta-adrenoceptor antagonism. *Eur J Clin Pharmacol* 1987;32:237-243.
- Williams AF, Barclay AN, Clark SJ, Paterson DJ, Willis AC. Similarities in sequences and cellular expression between rat CD2 and CD4 antigens. *J Exp Med* 1987;165:368-380
- Williams JM, Felten DL. Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: a comparative histofluorescence study. *Anat Rec* 1981;199:531-542.
- Williams KM, Lucas PJ, Bare CV, Wang J, Chu YW, Tayler E, Kapoor V, Gressl RE. CCL25 increases thymopoiesis after androgen withdrawal. *Blood* 2008;112:3255-3263.
- Wilkinson RW, Anderson G, Owen JJ, Jenkinson EJ. Positive selection of thymocytes involves sustained interactions with the thymic microenvironment. *J Immunol* 1995;155:5234-5240.
- Wilson CA, Davies DC. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction* 2007;33:331-359.
- Windmill KF, Lee VW. Influences of surgical castration on the thymus of male rats. *J Reprod Immunol* 1999;44:29-39.
- Windmill KF, Meade BJ, Lee KVW. Effect of prepubertal gonadectomy and sex steroid treatment on the growth and lymphocyte populations of the rat thymus. *Reprod Fertil Dev* 1993;5:73-81.
- Wood AJJ, Feldman R, Nadeau J: Physiological regulation of beta-receptors in man. *Clin Exp Hypertens* 1982;4:807-817
- Wright LL, Smolen AJ. Neonatal testosterone treatment increases neuron and synapse numbers in male rat superior cervical ganglion. *Dev Brain Res* 1983;8:145-153.
- Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 2005;17:304-12.

- Xi H, Schwartz R, Engel I, Murre C, Kersh GJ. Interplay between ROR γ mat, Egr3, and E proteins controls proliferation in response to pre-TCR signals. *Immunity* 2006;24:813-826.
- Xu XF, De Pergola G, Björntorp P. Testosterone increases lipolysis and the number of beta-adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrinology* 1991;128:379-382.
- Xu X, De Pergola G, Eriksson PS, Fu L, Carlsson B, Yang S, Edén S, Björntorp P. Postreceptor events involved in the up-regulation of beta-adrenergic receptor mediated lipolysis by testosterone in rat white adipocytes. *Endocrinology* 1993;132:1651-1657.
- Yager EJ, Ahmed M, Lanzer K, Randall TD, Woodland DL, Blackman MA. Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus. *J Exp Med* 2008;205:711-723.
- Yagi H, Matsumoto M, Suzuki R, Mishki R, Makino S, Harada M. Possible mechanisms of preventive effect of BCG against diabetes mellitus in NOD mice. *Cell Immunol* 1991;138:142-149.
- Yamashita I, Nagata T, Tada T, Nakayama T. CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int Immunol* 1993;5:1139-1150.
- Yao G, Liang J, Han X, Hou Y. In vivo modulation of the circulating lymphocyte subsets and monocytes by androgen. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1853-1860.
- Yao G, Shang XJ. A comparison of modulation of proliferation of thymocyte by testosterone, dehydroisoandrosterone and androstenedione in vitro. *Arch Androl* 2005;51:257-265.
- Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Stephens G, Durant L, Watford WT, Laurence A, Robinson GW, Shevach EM, Moriggl R, Hennighausen L, Wu C, O'Shea JJ. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 2007;109:4368-4375.
- Yarilin AA, Belyakov IM. Cytokines in the thymus: production and biological effects. *Curr Med Chem* 2004;11:447-464.
- Yasutomo K, Doyle C, Miele L, Fuchs C, Germain RN. The duration of antigen receptor signalling determines CD4⁺ versus CD8⁺ T-cell lineage fate. *Nature* 2000;404:506-510.

- Yu Q, Erman B, Park JH, Feigenbaum L, Singer A. IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and RORgammat: impact on thymocyte development. *J Exp Med* 2004;200:797-803.
- Zaitseva M, Kawamura T, Loomis R, Goldstein H, Blauvelt A, Golding H. Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus. *J Immunol* 2002;168:2609-2617
- Zamoyska R, Lovatt M. Signalling in T-lymphocyte development: integration of signalling pathways is the key. *Curr Opin Immunol* 2004;16:191-196.
- Zheng TS, Flavell RA. Divinations and surprises: genetic analysis of caspase function in mice. *Exp Cell Res* 2000;256:67-73.
- Zofková I, Kancheva RL, Hampl R. A decreasing CD4+/CD8+ ratio after one month of treatment with stanazolol in postmenopausal women. *Steroids* 1995;60:430-433.

BIOGRAFIJA

Ivan Pilipović je rođen 19.02.1975. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Diplomirao je 2004. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (izborna oblast: Eksperimentalna biomedicina) sa srednjom ocenom 8.8. Tema diplomskog rada: „Uticaj blokade β -adrenergičkih receptora na sazrevanje T-ćelija u timusu adultnih pacova”. Poslediplomske studije je upisao na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, 2004. godine. Doktorske studije u oblasti Neuroendokrinoimunologija, studijski program Animalna i humana fiziologija, modul Eksperimentalna endokrinologija, upisao je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, 2006. godine.

Zaposlen je u Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak”, u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ od 2005. godine, kao istraživač-pripravnik, a od 2008. godine kao istraživač-saradnik. Učestvovao je 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), a trenutno je uključen u realizaciju projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: imunomodulatorni potencijal estroгена“ (175050), koje je finansiralo/finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Član je Društva imunologa Srbije od 2006. godine.

Ivan Pilipović je do sada bio autor i koautor u 21 naučnoj publikaciji međunarodnog značaja (jedno poglavlje u monografiji međunarodnog značaja, četiri rada u vrhunskim međunarodnim časopisima, osam radova u istaknutim međunarodnim časopisima i osam radova u međunarodnim časopisima), kao i u sedam saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i šest saopštenja na skupovima nacionalnog značaja, iz uže naučne oblasti.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Иван Пилиповић _____
број индекса _____ АА060154 _____

Изјављујем

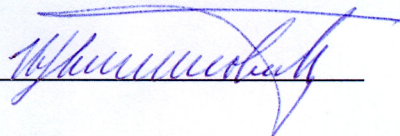
да је докторска дисертација под насловом

**КАТЕХОЛАМИНИ КАО МЕДИЈАТОРИ ДЕЛОВАЊА МУШКИХ ПОЛНИХ
ХОРМОНА НА ТИМОПОЕЗУ**

- 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, 15.10.2012 _____

 _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Иван Пилиповић
Број индекса АА060154
Студијски програм Анимална и хумана физиологија (Експериментална ендокринологија)
Наслов рада КАТЕХОЛАМИНИ КАО МЕДИЈАТОРИ ДЕЛОВАЊА МУШКИХ ПОЛНИХ ХОРМОНА НА ТИМОПОЕЗУ
Ментор Др Гордана Лепосавић, ред. проф. и др Гордана Цвијић, ред. проф.

Потписани/а Иван Пилиповић

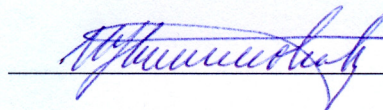
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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, 15.10.2012.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

КАТЕХОЛАМИНИ КАО МЕДИЈАТОРИ ДЕЛОВАЊА МУШКИХ ПОЛНИХ ХОРМОНА НА ТИМОПОЕЗУ

која је моје ауторско дело.

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

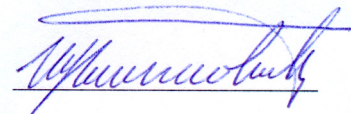
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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, 15.10.2012.



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.